



**HAL**  
open science

# Développement méthodologique du fractionnement par couplage flux / force (AF4) et spectroscopie optique pour l'étude de la matière organique dissoute aquatique : application aux estuaires de Seine et de Gironde

Jeremie Parot

► **To cite this version:**

Jeremie Parot. Développement méthodologique du fractionnement par couplage flux / force (AF4) et spectroscopie optique pour l'étude de la matière organique dissoute aquatique : application aux estuaires de Seine et de Gironde. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0363 . tel-01599258

**HAL Id: tel-01599258**

**<https://theses.hal.science/tel-01599258v1>**

Submitted on 2 Oct 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**  
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Jérémie PAROT

**Développement méthodologique du fractionnement par  
couplage flux / force (AF4) et spectroscopie optique pour  
l'étude de la matière organique dissoute aquatique  
Application aux estuaires de Seine et de Gironde**

Sous la direction de : Edith PARLANTI

Soutenue le 09 décembre 2016

Membres du jury :

Mme HUCLIER Sandrine	Maitre de conférences, Université de Nantes	Rapporteur
M. BENEDETTI Marc	Professeur, Université Paris Diderot	Rapporteur
Mme RICHARD Claire	Directrice de recherche, UBP (Clermont-Ferrand)	Examineur
M. HUGUET Arnaud	Chargé de recherche, UPMC (Paris)	Examineur
M. GREMARE Antoine	Professeur, Université de Bordeaux	Examineur







## Unité de recherche

Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC)  
UMR 5805 CNRS

L'équipe de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC)

Université de Bordeaux

Bâtiment A12, 2<sup>ème</sup> étage Ouest  
351 cours de la libération  
33405 TALENCE Cedex  
France



## Avant-propos

En premier lieu, je tiens à m'excuser auprès de ceux que je pourrais oublier dans ces remerciements.

Ces travaux ont été menés dans le cadre des programmes de recherche Projet MOSAIC – Programme Seine Aval 5 et Projets LIGA et OSQUAR 2 – Région Aquitaine. Les différents financeurs et partenaires (Université de Bordeaux, L'Agence Nationale de la Recherche française (ANR), le LabEx COTE, University of Trent) sont vivement remerciés pour leur soutien.

J'adresse tous mes remerciements à Sandrine Huclier, Maître de Conférence à l'Université de Nantes, et Marc Benedetti, Professeur à l'Université Paris Diderot, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Claire Richard, Directrice de Recherche à l'Université Blaise-Pascal, et Arnaud Huguet, Chargé de Recherche à l'Université Pierre et Marie Curie, d'avoir accepté de faire partie du jury et à Antoine Grémare, Professeur à l'Université de Bordeaux pour avoir présidé le jury de soutenance. Enfin je tiens à remercier l'ensemble du jury pour ses remarques, conseils, encouragements au cours de la soutenance qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Edith, je t'adresse mes plus sincères remerciements. Je te remercie bien évidemment pour m'avoir fait confiance pour cette thèse mais également pour la confiance que tu m'as témoignée durant ces trois années. Merci pour toutes nos discussions et riches échanges, pour ta disponibilité et pour m'avoir transmis ta passion et ta valeur de la recherche.

Trois belles années au LPTC... J'adresse mes très sincères remerciements à l'ensemble des membres, permanents, non-permanents, doctorants, stagiaires de cette équipe pour leur présence et les bons moments passés ensemble. Hélène, un grand merci pour nos nombreuses discussions, débats, pour ton aide, tes conseils et remarques tout au long de ces années.

J'adresse mes remerciements tous les membres de l'UMR EPOC pour leur accueil. Merci à la direction et aux membres du conseil de laboratoire pour m'avoir fait confiance en tant que représentant des doctorants ; ce fut une mission très enrichissante tant personnelle que professionnelle.

Je tiens à remercier le LabEx COTE pour m'avoir permis de réaliser une mobilité internationale au sein de l'Université de Trent (Ontario, Canada). J'en profite pour adresser des remerciements chaleureux à Claire et Adrien pour les bons moments partagés.

Un immense merci à Céline Guéguen pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je tiens à tous vous remercier Céline, Chad Cuss, Vaughn Mangal et tous les autres membres du groupe de recherche pour votre accueil, aide, présence et pour m'avoir fait vivre le Canada, le vrai en plein hiver...



Un grand merci à Emmanuel Mignard et Gérald Clisson du Laboratoire Of Future (LOF) pour m'avoir permis de travailler au sein de leur laboratoire et d'utiliser les équipements.

Je remercie Christian Coelho pour m'avoir fait découvrir la chimie du vin.

Je tiens à remercier tous les personnes qui ont participé aux différentes campagnes de prélèvement, HALOGIR (Pierre Labadie, Mathilde Lauzent et Gabriel Munoz), MOSAIC (Arnaud Huguet, Clara Micheau et Alexandre Thibault) et LIGA (Nicolas Susperregui). Merci aux équipages du Côtes de la Manche.

Merci beaucoup aux nombreux stagiaires qui ont contribué à ce travail, Claire, Emmeline, Julie, Charly, Cyndo... Un grand merci à Clara pour son aide précieuse et nos passionnantes discussions.

Nathalie Coquillé, je te remercie chaleureusement pour avoir su m'entraîner à faire des statistiques mais surtout à utiliser R ! Merci pour tes conseils et tes encouragements dans cette démarche. Un grand merci à Jean-Luc Giraudel pour m'avoir aidé dans l'utilisation des Self-Organizing Maps et pour ses précieux conseils.

Merci à tous les doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer. Merci à tous pour votre soutien et les bons moments passés ensemble, j'encourage particulièrement ceux qui sont en train de constituer leur travail de thèse.

Encore merci à tous, pour les bons moments partagés, tout au long de ces trois ans, et merci pour votre présence le jour de la soutenance.

Enfin je tiens à remercier les membres de ma famille, pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci d'y avoir cru depuis le début. Merci également à ma belle-famille pour leur soutien inconditionnel.

Justine que dire de plus que MERCI pour tout.





## Sommaire générale

Abréviations .....	17
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>23</b>
I La matière organique .....	24
1 Informations globales.....	24
2 Sources .....	26
3 Apports terrigènes.....	28
4 Composition de la matière organique dissoute (MOD) .....	30
5 Facteurs contrôlant la MOD .....	42
6 Interactions MOD-contaminants.....	45
II Analyse et caractérisation de la matière organique dissoute .....	48
1 Défis analytiques .....	48
1 Méthodes d'analyse et de caractérisation .....	48
<b>Enjeux liés aux développements de méthodes d'analyse pour la MOD.....</b>	<b>67</b>
<b>Objectifs des travaux de thèse .....</b>	<b>69</b>
<b>Chapitre II Matériel et méthodes .....</b>	<b>71</b>
I Sites d'échantillonnage .....	72
1 Estuaire de la Gironde .....	72
2 Estuaire de la Seine .....	76
3 Biarritz – Golfe de Gascogne .....	82
4 Arcachon.....	83
II Outils et méthodes utilisés .....	84
1 Préparation des échantillons :.....	84
2 Technique de fractionnement par couplage flux/force .....	84
3 Techniques spectroscopiques .....	110
4 Mesure de carbone organique dissous (COD).....	119
III Approches statistiques .....	122

1 Les tests de corrélation : Spearman .....	122
2 Modèle de régression linéaire.....	122
3 Cartes de Kohonen : Self-Organizing Maps (SOM).....	123
<b>Chapitre III Optimisation et évaluation de la technique de fractionnement par couplage flux force pour l'étude de la MOD .....</b>	<b>127</b>
Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation for the investigation of aquatic dissolved organic matter molecular weight .....	130
I Introduction.....	131
II Theory.....	133
1 Recovery calculations .....	133
2 Relationship between retention time and molecular weight .....	134
3 Measurements of DOM standards .....	136
III Experimental .....	136
1 Chemicals.....	136
2 Instrumentation.....	137
3 Experimental conditions.....	138
IV Results and discussion.....	139
1 AF4 optimization .....	139
2 Method validation, performance and efficiency.....	147
V Conclusion .....	149
<b>Chapitre IV Evaluation de deux méthodes de séparation AF4 – application à l'étude de la dynamique de la masse moléculaire en estuaire de Gironde.....</b>	<b>151</b>
I Matériel et méthodes.....	152
1 Sites d'études .....	152
2 Analyses des masses moléculaires moyennes par AF4 .....	153
3 Mise en avant des différences, avantages et inconvénients.....	160
II Détermination de la taille moléculaire de la MOD par deux techniques AF4 dans l'estuaire de la Gironde.....	161
III Conclusions et perspectives .....	174
<b>Chapitre V Etude de la dynamique de la matière organique dissoute en estuaire de Gironde – Application de l'AF4 associée aux techniques spectroscopiques.....</b>	<b>177</b>

Variations in dissolved organic matter molecular weight and optical properties along a microtidal estuary.....	179
Abstract .....	179
I Introduction.....	180
II Experimental .....	181
1 Study Site and Sampling Strategy.....	181
2 DOM analysis.....	184
3 Statistical analyses.....	185
III Results and discussion.....	187
1 Water Quality Parameters and Hydrology .....	187
2 Spatial Variations of DOM compositional parameters.....	188
3 Principal component analysis and influence of hydrography .....	196
4 Correlations .....	199
IV Conclusion .....	199
<b>Chapitre VI Etude de la dynamique de la matière organique dissoute en estuaire de Seine – Application de l’AF4 associée aux techniques spectroscopiques.....</b>	<b>205</b>
Characterization of dissolved organic matter from river to ocean in the Seine estuary using molecular weight distribution and optical properties .....	207
Abstract .....	207
I Introduction.....	208
II Experimental .....	210
1 Study Site and Sampling Strategy.....	210
2. DOM analyzes.....	212
III Results and discussion.....	214
1 Environmental data and DOC concentration .....	214
2 Variations in CDOM characteristics.....	215
3 Molecular weight distribution along the estuary gradient .....	218
4 Statistical analysis of samples from the river-to-ocean continuum.....	219
IV Conclusions .....	224
Seasonal dynamic of dissolved organic matter of the Seine estuary using multiple analytical and statistical approaches.....	228

Abstract .....	228
V Introduction .....	229
VI Experimental .....	230
1 Study Site and Sampling Strategy.....	230
3. DOM analysis.....	231
VII Results and discussion.....	237
1 Environmental data and DOC concentration .....	237
2 Variations in CDOM characteristics.....	238
3 Molecular weight distribution along the estuary gradient .....	239
4 Variations in fluorescence properties .....	240
5 PARAFAC modelling.....	242
6 Multiple linear regression (MLR) models .....	246
7 Self-organizing maps (SOM) .....	250
VIII Conclusions .....	255
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>261</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>269</b>
<b>Références .....</b>	<b>315</b>
<b>Liste des productions scientifiques.....</b>	<b>350</b>







## Abréviations

Français		Anglais
ACP	Analyse en Composante Principale	PCA
AF4	Fractionnement par couplage flux-Force avec flux asymétrique	AF4
BIX	indice d'activité biologique	BIX
BV	Bouchon vaseux	MTZ
COD	Carbone Organique Dissous	DOC
COT	Carbone Organique Total	TOC
Da	Dalton	Da
FFF	Fractionnement par couplage Flux-Force	FFF
HIX	Indice d'humification	HIX
MALLS	Détecteur à diffusion de lumière multi-angle	MALLS
MES	Matière en suspension	SPM
MLR	Modèle de régression linéaire	MLR
MM	Masse moléculaire	MW
MMA	Masse moléculaire apparente	AMW
MO	Matière organique	OM
MOD	Matière organique dissoute	DOM
MODC	Matière organique dissoute chromophorique	CDOM
MODF	Matière organique dissoute fluorescente	FDOM
MON	Matière organique naturelle	NOM
MOP	Matière organique particulaire	POM
PARAFAC	Parallèle factor analysis	PARAFAC
PES	Polyethersulfone	PES
PF	Peat Fulvic	PF
PK	Point kilométrique	KP
PSS	Polystyrenesulfonate	PSS
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique	SEC
SOM	Self-organizing maps	SOM
SR	rapport de pente spectrale	SR
SRFA	acide fulvique Suwannee River	SRFA
tr	Temps de rétention	RT
UV/Vis	Ultraviolet- visible	UV/Vis



## INTRODUCTION GENERALE

La matière organique dissoute (MOD), omniprésente dans tous les compartiments aquatiques, permet notamment aux océans d'être l'un des plus grands réservoirs de carbone bio-réactifs à la surface de la Terre (Hedges, 1992). Cette matière organique se trouve à 90% sous forme dissoute (MOD) inférieure à  $0,70\mu\text{m}$  et à 10% sous forme particulaire (MOP) supérieure à  $0,70\mu\text{m}$ . Cette MOD provient de sources multiples que ce soit autochtones (biomasse, activités bactérienne et microbienne...), allochtones (décomposition végétale, lessivage des sols...) (Labanowski, 2004) ou encore anthropique (agriculture, industrie, rejets de station d'épuration...) (Mostofa et al., 2013). De ce fait, la MOD diffère entre les différents compartiments aquatiques et les milieux (océan, rivière, aquifère, sol...).

La MOD joue un rôle important dans l'ensemble des grands cycles biogéochimiques que ce soit pour le carbone, l'azote, le phosphore... Elle représente un élément essentiel, en tant que source de nutriments à la base des chaînes alimentaires pour les organismes vivants (Benner and Biddanda, 1998; Wetzel et al., 1995). Elle est donc considérée comme prépondérante dans le bon fonctionnement des milieux aquatiques de par son rôle dans les premiers niveaux des réseaux trophiques.

La composition de la MOD dans les milieux aquatiques est infiniment complexe et difficile à appréhender (Filella, 2009). C'est un mélange très hétérogène de molécules aux propriétés chimiques diverses directement impactées par ses origines, ses sources et les conditions environnementales. Aujourd'hui, le changement climatique, observé au niveau des précipitations, de la production primaire, des rayonnements solaires et des températures, influence la qualité et les concentrations de MOD. Cependant il est encore difficile de bien comprendre les facteurs contrôlant sa qualité et sa quantité.

Depuis maintenant des années, des suivis environnementaux ont été mis en place afin de progresser dans la compréhension des sources, des devenir et des conséquences de la présence de potentiels polluants chimiques dans l'environnement. Les réflexions actuelles sur le sujet ont émergé de la prise de conscience des impacts des molécules synthétisées et naturelles en quantité de plus en plus grandes. Ces molécules sont utilisées à des fins tout autant industrielles, agricoles, domestiques ou bien thérapeutiques dont on ignore encore les effets à court, moyen et long termes sur l'ensemble des êtres vivants.

Certains contaminants à l'image des métaux lourds, des polluants organiques (pesticides, médicaments...) ou bien des nanoparticules, finissent à l'état de traces (ng/L ou moins) dans l'ensemble des compartiments de l'environnement (eau, air, sol et les interfaces). Les océans et mers

sont considérés comme le réceptacle ultime de tous ces composés, les recherches ont donc mis l'accent sur les milieux aquatiques naturels afin de faire un premier état des lieux.

De multiples paramètres peuvent influencer la spéciation, la biodisponibilité, le transport et le devenir des contaminants dans l'environnement, par exemple la quantité de particules dans l'eau ou bien la matière organique. Il est donc essentiel de s'intéresser à la matière organique dans les environnements aquatiques notamment afin de mieux comprendre les différents types, structures, tailles de ses constituants ainsi que les mécanismes pouvant régir son évolution et ses capacités d'association avec les contaminants.

Les estuaires et les zones côtières sont parmi les écosystèmes les plus productifs au monde et présentent un grand intérêt tant sur le plan écologique qu'économique. Ils constituent des zones de transitions très complexes entre les eaux douces et marines et jouent un rôle essentiel en termes de transferts de matière organique, naturelle et anthropique. Le mélange des eaux océaniques avec les apports continus en eau douce issus des bassins versants engendrent des eaux saumâtres, caractérisées par des processus physiques, chimiques et biologiques complexes et spécifiques aux estuaires.

L'étude de la MOD par séparation/isolement et/ou caractérisation est difficile et, malgré des décennies de recherche, constitue toujours un défi à l'échelle internationale. Elle reste encore mal-connue en raison de ses faibles concentrations dans les milieux naturels et de sa grande hétérogénéité et complexité. Au cours des dernières années de nombreuses techniques de séparation/isolement ont été utilisées afin d'étudier la MOD par fraction (de tailles, de propriétés chimiques...). Cependant ces techniques, souvent longues à mettre en œuvre, ne permettent pas un isolement conséquent et représentatif de la MOD.

Aujourd'hui obtenir une caractérisation fine et complète de la matière organique dissoute et colloïdale naturelle représente un véritable enjeu dans de nombreux domaines. Il apparaît ainsi primordial de développer de nouveaux outils et méthodes permettant d'améliorer la qualité de la caractérisation de la MOD. Pendant des décennies, les techniques de spectroscopies optiques et de chromatographies ont été déployées dans le cadre d'études sur la MOD en milieu naturel sans pour autant en fournir une caractérisation précise. L'évolution des technologies de chimie analytique offre de nouvelles perspectives depuis quelques années. Dans ce sens, les développements et optimisations actuels de techniques et méthodes (fractionnement par couplage flux/force, spectrométrie de masse haute-résolution,...) sont menés pour la caractérisation structurale, moléculaire et élémentaire de la MOD. L'utilisation de différentes techniques permet l'obtention d'un grand nombre d'informations sur un

même échantillon et permet de pallier à certaines difficultés analytiques propres à telle ou telle techniques.

Les techniques de séparation ont plus particulièrement été développées notamment la chromatographie d'exclusion stérique et plus récemment pour l'étude de la MOD, le fractionnement par couplage flux-force avec flux asymétrique (AF4). Cette dernière technique, l'AF4, offre de belles perspectives pour l'étude de la MOD, permettant dans un premier temps de déterminer sa masse moléculaire moyenne puis potentiellement l'étude de fractions de tailles de MOD (S. Dubascoux et al., 2008; Guéguen and Cuss, 2011). Cependant l'utilisation de cette technique nécessite encore des phases de développement et d'optimisation afin de s'assurer des bonnes performances analytiques pour l'étude de la MOD aquatique naturelle. L'association de cette technique permettant la détermination de la masse moléculaire moyenne avec les techniques de spectroscopie UV/Vis et de fluorescence permet de caractériser la MOD en termes de tailles et de propriétés globales.

Ces travaux de thèse avaient pour but de développer des méthodes analytiques complémentaires (AF4) et des outils permettant une étude fiable et la plus complète possible de la matière organique dissoute afin de mieux comprendre son évolution et sa dynamique dans les environnements aquatiques naturels. La méthodologie ainsi développée a ensuite été appliquée à l'étude de la MOD provenant de différents environnements aquatiques et notamment des estuaires de Seine et de Gironde. Ce manuscrit s'articule autour des 6 chapitres listés ci-dessous.

Le **chapitre I** synthétise les connaissances actuelles concernant la matière organique dissoute dans les écosystèmes naturels, les différentes techniques permettant son étude ainsi que les enjeux et objectifs de cette thèse.

Le **chapitre II** (matériel et méthode) présente les sites d'études, les outils analytiques et les méthodes nécessaires à cette étude.

Le développement et l'optimisation d'une méthode de séparation et analyse par AF4 pour la caractérisation de la MOD naturelle sont présentés dans le **chapitre III**.

Le **chapitre IV** compare la méthodologie développée dans le chapitre précédent avec une autre méthode utilisée dans le cadre d'une mobilité au Canada sur un système AF4 différent.

La méthode développée et présentée chapitre III montrant de bonnes performances pour l'étude de la MOD naturelle, elle a donc été appliquée à l'étude de la MOD dans l'estuaire de la Gironde. Les résultats sont présentés dans le **chapitre V**.

La suite des travaux, dans le **chapitre VI**, se focalise sur l'étude de la MOD en estuaire de Seine. Une première partie présente la dynamique de la MOD en fonction du cycle de marée. Une deuxième partie

détaille et compare les caractéristiques de la MOD en fonction de la saison à l'aide de différentes approches statistiques.

## Chapitre I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



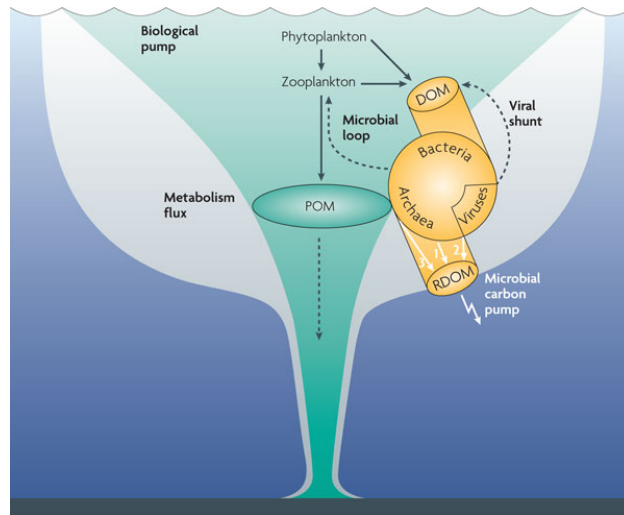
# I La matière organique

## 1 Informations globales

Il y a plus de 100 ans, August Pütter, un phytophysiologiste, a fait une grande découverte (Pütter 1907) : « une comparaison de la quantité de matière qui est dissoute dans l'océan avec celle présente dans les organismes, montre comment la quantité de masse formée est extraordinairement faible comparée à celle qui est informée » (traduit du texte original en Allemand). Pütter considère la matière « informée » comme les composants dissous dans l'eau de mer qui passent à travers un filtre, et cette opération définit la matière organique dissoute (MOD) ce qui reste encore vrai de nos jours. Pütter définit l'océan comme une soupe de nutriments riches, dans laquelle les organismes hétérotrophes prospèrent. L'apparent déséquilibre entre l'énorme quantité de substrat organique disponible, et la faible quantité de cellules vivantes inspire Pütter qui en vient à se dire que la MOD peut être la source principale de nourriture pour une majorité de la vie dans les océans, incluant les poissons et autres être-vivants multicellulaires. Cette théorie est, quelques années plus tard, rejetée mais le paradoxe de la quantité de MOD est déjà un fait établi.

Aujourd'hui après des millions d'années de vie sur Terre, le carbone organique dissous (COD) accumulé dans les océans représente plus de 55 Pmol-C (1 Pmol =  $10^{15}$  mol), pour en faire un des plus grands réservoirs de matière organique à la surface de la Terre et un gigantesque stock de carbone, en comparaison aux 0,25 Pmol-C que représente l'ensemble des êtres-vivants dans les océans (Hansell et al., 2009; Hedges, 1992). Il est indéniable que la MOD prend part au déséquilibre thermodynamique dans les océans, où sa réactivité avec l'oxygène abondant, entraîne la production d'énergie et d'éléments essentiels pour les microorganismes. En raison de son immense pool de carbone et de sa grande importance sur Terre, un changement même mineur dans la dynamique de la MOD à la surface de la Terre, impacterait les grands cycles biogéochimiques. Pour ces raisons, il apparaît essentiel d'étudier la MOD.

Associé à son rôle dans le cycle du carbone, la MOD joue un rôle majeur dans les processus biogéochimiques. Elle constitue le premier intermédiaire et le maillon essentiel dans les flux d'énergie, au sens large, entre les organismes autotrophes et les hétérotrophes microbiens (Carlson et al., 2007; Moore et al., 1912). Ainsi, la majorité de la production primaire est concentrée par la pompe microbienne de la MOD (Figure I-1) (Jiao et al., 2010), et la demande en carbone des bactéries de la zone euphotique peut être bien supérieure à la production primaire (Del Giorgio et al., 1997; Del Giorgio and Cole, 1998). Dans le même temps, les flux de carbone terrigène vers les océans sont en partie contrôlés par la MOD (Hedges, 1992).



Nature Reviews | Microbiology

Figure I-1 : Représentation des processus biologiques intervenant dans le cycle du carbone océanique: pompe biologique et microbienne (d'après Jiao et al. 2010)

La MOD est quantifiable principalement par la mesure de carbone organique dissous (COD) (Sharp et al., 2002) étant donné qu'il est son principal constituant. Le COD représente entre 650 et 750 Gigatonnes dans les océans (Hansell and Carlson, 2001; Jiao et al., 2010) soit des teneurs proches du carbone se trouvant dans la biomasse végétale terrestre (570Gt) et dans l'atmosphère (750Gt) (Gorham, 1991; Hedges, 1992, 2002). Dans le cas de variations du « pool » océanique de COD, des conséquences directes sur le stock de CO<sub>2</sub> atmosphérique, et donc sur la balance radiative de la Terre peuvent avoir lieu. Cet immense réservoir de carbone océanique au centre de très nombreux processus, démontre l'importance de l'étude de la MOD dans le cycle global du carbone (Figure I-2).

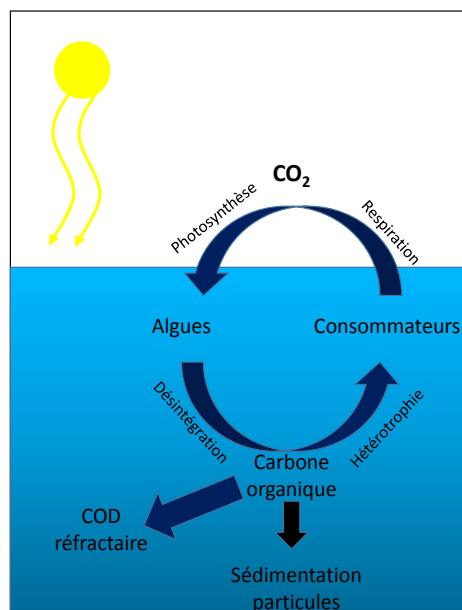


Figure I-2: Schéma du cycle du carbone dans les eaux superficielles

La MOD contient également de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore et du soufre, auxquels s'ajoutent de nombreux éléments traces comme les métaux qui y sont souvent liés. Comme l'ensemble de ces éléments sont en concentration relativement limitée mais néanmoins primordiale, leur présence dans la MOD peut avoir des conséquences majeures pour les cycles biogéochimiques.

## 2 Sources

Une très grande partie des sources de carbone organique dans les océans provient des zones épipelagiques euphotiques, où les microorganismes photosynthétiques utilisent l'énergie lumineuse pour convertir le carbone inorganique en molécules organiques (Figure I-2). Ces minuscules mais très nombreux microorganismes sont capables de fixer approximativement la même quantité de carbone (production primaire :  $8,3 - 10,8 \text{ Pmol-C}\cdot\text{year}^{-1}$ ) que les plantes supérieures sur Terre ( $8,3 - 13,3 \text{ Pmol-C}\cdot\text{year}^{-1}$ ) (Del Giorgio and Duarte, 2002; Field et al., 1998; Kattge et al., 2009; Koffi et al., 2012; Williams, 1998; Williams and del Giorgio, 2005).

Dans les océans, la MOD se trouvant dans la zone euphotique, provient principalement des activités biologiques, à partir des processus d'exsudation du phytoplancton, et des bactéries, d'excrétion du zooplancton et dissolution des fèces (Mague et al., 1980; Mykkestad, 2000; Sempéré et al., 2000). Une partie de cette MOD récemment produite est rapidement consommée par des bactéries hétérotrophes (ce qui représente 50% de la production primaire mondiale), et cette assimilation peut aboutir soit à une minéralisation en  $\text{CO}_2$  et sels nutritifs, soit à une incorporation à la matière organique particulaire (MOP) (biomasse qui devient donc disponible pour les réseaux trophiques supérieurs (Figure I-2) (Azam et al., 1983; Cho and Azam, 1990), soit à une production de MOD réfractaire à la base de la pompe microbienne du carbone (Figure I-1) (Eichinger et al., 2011; Jiao et al., 2010).

La MOD dans les zones estuariennes est composée de molécules organiques provenant de très diverses sources autochtones ou allochtones (Aitkenhead-Peterson et al., 2003; Bertilsson and Jones, 2003). En effet deux sources majoritaires se dégagent, d'un côté les apports terrestres et d'un autre les apports océaniques qui font des estuaires des zones particulièrement complexes avec des MOD aux caractéristiques biogéochimiques spéciales. Toutes les sources naturelles, allochtones ou autochtones, sont initialement dérivées d'organismes aquatiques ou terrestres autotrophes (algues multi et uni-cellulaires et les plantes supérieures) et hétérotrophes (bactéries, champignons, organismes multi-cellulaires) et résultent d'une multitude de processus.

Les apports terrestres en MOD dans les rivières et les estuaires proviennent de la végétation et des sols (Malcolm, 1990; Opsahl and Benner, 1997). Les sols sont indéniablement les sources principales en MOD dans une grande majorité des rivières mais leur complexité et hydrologie ainsi que le nombre

de variables participant à la mobilisation des molécules organiques rendent les études sur les transferts entre les sols et les eaux terrestres difficiles. De plus les changements d'usage des sols sont suspectés pour avoir de grandes influences sur les transferts de MOD entre les sols et les eaux (Stedmon et al., 2006). Cependant, leurs impacts ne sont pas que quantitatifs mais également qualitatifs avec des modifications de type de MOD (Bauer and Bianchi, 2011; Findlay et al., 2001; Stedmon et al., 2006). Dans de nombreux bassins versants, les temps de résidence et de transport plutôt longs de la MOD vont entraîner des modifications significatives par des facteurs biotiques et abiotiques. Finalement d'un point de vue global, les apports des rivières représentent approximativement entre 0,8 et 1 Gt de carbone annuellement dans les estuaires et les zones océaniques (Figure I-3) (Degens et al., 1991; Denman et al., 2007; Hedges et al., 1997; Meybeck and Vörösmarty, 1999).

L'étude des cycles globaux en milieu océanique indique que le cycle de la MOD est quasiment entièrement alimenté et entretenu par la production marine, et que les autres sources potentielles sont seulement qualitativement significatives (parties continentales et potentiellement les fonds marins) (Hansell et al., 2012, 2009; Hansell and Carlson, 1998) (Figure I-3). Dans le même sens, il y a approximativement seulement 0,5-1% de la production primaire sur les continents (apports dits allochtones) qui est transportée dans les océans par les fleuves et rivières (Hedges et al., 1997; Opsahl and Benner, 1997), la pompe tidale (Dittmar and Koch, 2006) ou bien par les aérosols (Hernes and Benner, 2006).

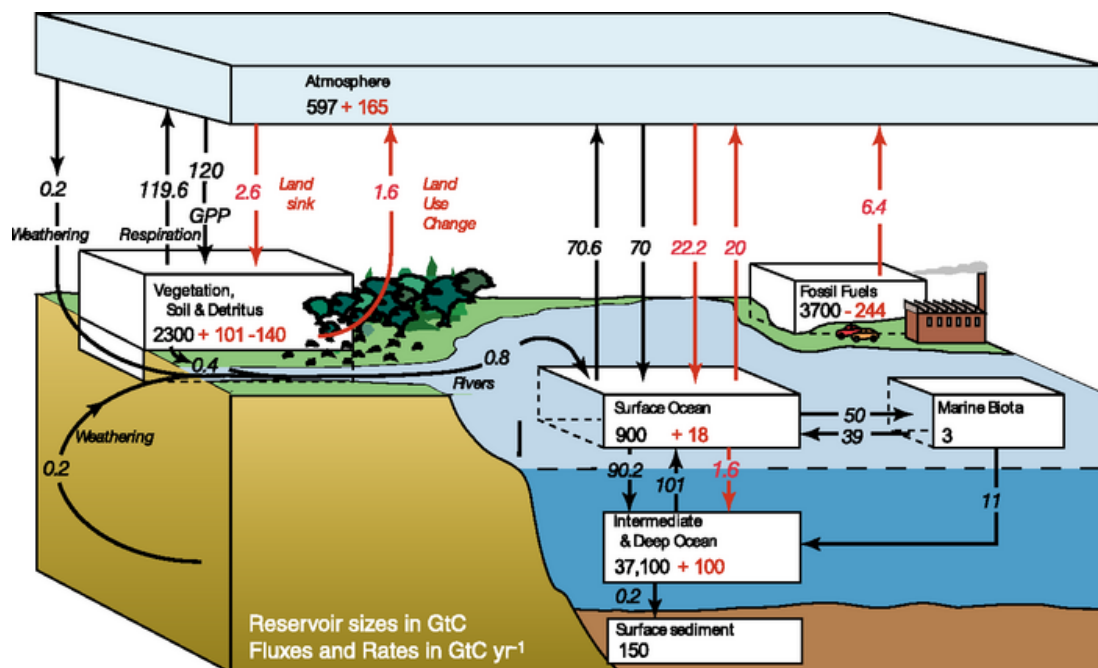


Figure I-3: Cycle global du carbone: réservoirs (Gt C) et flux (Gt.an<sup>-1</sup>) naturels (flèches noires) et anthropogéniques (flèches rouges) (IPCC, 2007 (Denman et al., 2007))

### 3 Apports terrigènes

Les apports terrigènes de MOD complètent le pool de COD marin. Cependant des niveaux très faibles de MOD terrestre sont retrouvés au sein des océans, ce qui suggère que ces molécules organiques sont, soit minéralisées, soit modifiées par divers processus, (sédimentation, floculation, photodégradation...) très tôt après leur arrivée dans les milieux côtiers.

La MOD des eaux terrestres est souvent caractérisée comme labile, étant donné l'état hétérotrophe de la plupart de ces eaux, où l'ensemble des chaînes alimentaires sont basées sur les apports allochtones en composés organiques venant des sols ou de la végétation (Aitkenhead-Peterson et al., 2003). La minéralisation de la MOD dans les eaux terrestres entraîne un flux de CO<sub>2</sub> des rivières vers l'atmosphère (Figure I-2), qui est supérieur au flux entre les rivières et les océans. Ainsi, les eaux terrestres jouent un rôle de réacteur à minéralisation de la MOD avant qu'elle ne puisse atteindre les zones côtières. Il a été démontré que le flux de CO<sub>2</sub> entre l'Amazonie et l'atmosphère est environ 10 fois supérieur au flux de carbone allant vers l'océan Atlantique (Richey et al., 2002). Ainsi la minéralisation et la modification de la MOD des eaux terrestres peuvent être expliquées par la combinaison de la consommation de la MOD par les bactéries et cyanobactéries hétérotrophes, la photo-minéralisation par la lumière du soleil, les agrégations moléculaires et les phénomènes de floculation (von Wachenfeldt and Tranvik, 2008), les adsorptions sur des particules minérales. Le temps de résidence des eaux dans les bassins terrestres, et donc de la MOD, semble être un des facteurs clés des changements de MOD et de son élimination avant son rejet dans les zones côtières. La bio et/ou photo labilité de la MOD sont donc réduites durant son transit à travers les eaux terrestres, de telle sorte que les molécules organiques qui arrivent dans les océans ont perdu leurs parties les plus réactives. Au final la MOD d'origine terrigène qui arrive enfin dans les zones côtières, puis dans les océans, est plutôt définie comme réfractaire.

Les grands estuaires n'apparaissent cependant pas comme étant des barrières à la MOD terrestre. Sur l'échelle de temps de mélange et de dispersion de la MOD dans les estuaires et les bassins versants, elle conserve une grande partie de ses propriétés. Par contre la réactivité de la MOD terrestre dans les écosystèmes marins est bien moins connue. Des observations faites dans l'océan Arctique ont montré qu'il recevait plus de COD terrestre que tout autre océan sur Terre (Dittmar and Kattner, 2003). Dans la partie Sibérienne, le COD terrestre se mélange avec les eaux océaniques de façon conservative, (Dittmar and Kattner, 2003) mais au final seulement 25-33% du COD terrestre rejeté par les rivières de l'Arctique finit dans l'océan Atlantique (Benner et al., 2005), sûrement en raison de l'activité microbienne (pompe microbienne). Dans les tropiques, la photo-dégradation peut être le facteur le plus important dans la modification de la MOD terrigène. La MOD terrestre de la rivière Congo, ou bien des mangroves au nord du Brésil, est modifiée et impactée par la photochimie en raison des rayons

lumineux solaires, ce qui se traduit par des modifications moléculaires (Benner, 2003, 2002; Dittmar et al., 2007; Robert G. M. Spencer et al., 2009; Tremblay et al., 2007). Dans les eaux profondes, les traces de signatures moléculaires de MOD terrestre indiquent des phénomènes de photo-dégradation (Hernes and Benner, 2002).

Ainsi, comme une partie des molécules organiques provenant des eaux terrestres sont dégradées dans un laps de temps assez court, il apparaît donc plausible que l'ensemble de la MOD terrestre se jetant dans les océans, soit minéralisée pendant son transport à la surface des eaux côtières et marines. Des études sur les signatures isotopiques et moléculaires de MOD de pleine mer indiquent que des quantités minimales de MOP et MOD terrestres sont également minéralisées au cours de leur dispersion depuis les zones côtières jusque dans les océans profonds.

Dans les eaux côtières, la MOD d'origine terrestre peut être retrouvée en grande concentration et de sources diverses. Les apports terrestres ont en effet une variabilité géographique et temporelle importante. Les phénomènes d'upwelling et les apports de nutriments et de MOD terrestre permettent de favoriser les grands blooms phytoplanctoniques. De ce fait, de grandes concentrations de COD labile d'origine planctonique sont souvent trouvées dans les zones côtières. Les apports directs en matière organique par les fleuves/rivières, les eaux souterraines ou bien la marée, entraînent de très forts gradients de concentrations en COD sur les côtes (Dittmar et al., 2006; Hedges et al., 1997; Santos et al., 2009). Ainsi les flux continentaux sont très variables dans le temps et dans l'espace, les zones côtières ne sont pas toutes influencées de la même façon. Par exemple, les flux continentaux dans les zones arctiques et tropicales sont plus importants que ceux des zones tempérées. Les régions d'Arctique caractérisées par des apports fluviaux très importants en font une des régions avec le taux de COD le plus fort en surface d'eaux marines (Dittmar and Kattner, 2003). Cependant, étant donné que les rivières sont libérées des glaces en été, plus de la moitié des apports en COD se font pendant les périodes estivales (Holmes et al., 2012). Ainsi les apports en COD durant les 6 mois d'hiver ne représentent que 12% des apports annuels en Arctique. A titre de comparaison dans les tropiques, les rivières Amazone, Congo et Orinoco apportent une part conséquente du COD dans l'océan Atlantique, mais les flux de ces rivières montrent des variabilités moins saisonnières (Coynel et al., 2005).

De plus selon le type de bassins versants et les paramètres physico-chimiques des fleuves et rivières, la structure, la composition et la dégradation de la MOD terrigène peuvent être très variables (Bronk, 2002).

## 4 Composition de la matière organique dissoute (MOD)

La matière organique dans les eaux naturelles est communément divisée en matière organique particulaire et matière organique dissoute basée sur un seuil de filtration généralement fixé à 0,45µm ou 0,7µm. Dans la réalité, la matière organique dans les environnements aquatiques peut être définie par un continuum de taille allant de 0,1 nm à 1µm (Figure I-4) et les deux catégories, MOD et MOP, ne sont pas séparées selon un seuil de coupure naturel, mais de façon opérationnelle en fonction de la taille de pore des filtres utilisés, c'est-à-dire entre 0,1 et 0,8µm selon les études (Asmala et al., 2013). La MOD inclut donc la fraction colloïdale qui se comporte comme des molécules solides en suspension, mais qui sont considérées comme des solutés. La matière organique colloïdale dans les eaux naturelles est composée de microorganismes vivants et en senescence, d'exsudats cellulaires, de matériel détritique... La matière organique, qu'elle soit d'origine naturelle ou anthropique, peut se retrouver sous forme dissoute, colloïdale, de particules libres ou sous forme de sédiments aquatiques (Figure I-4).

Les colloïdes sont des composés organiques ou inorganiques ayant une taille suffisamment grande pour avoir une structure et des propriétés supramoléculaires. Ces composés ont la spécificité de rester en suspension dans l'eau en l'absence d'agrégation pendant un laps de temps assez long (Buffle, 2006; Buffle et al., 1998; Citeau et al., 2003), et sont traditionnellement définis comme une phase dispersée dans une solution aqueuse (Hennebert et al., 2013). D'après l'IUPAC (1997), les colloïdes sont des molécules ou des particules polymoléculaires dispersées dans un milieu, et ayant au moins dans une direction, une dimension comprise entre 1 nm et 1 µm. Le critère de la taille permet donc de définir de façon simple les particules colloïdales.

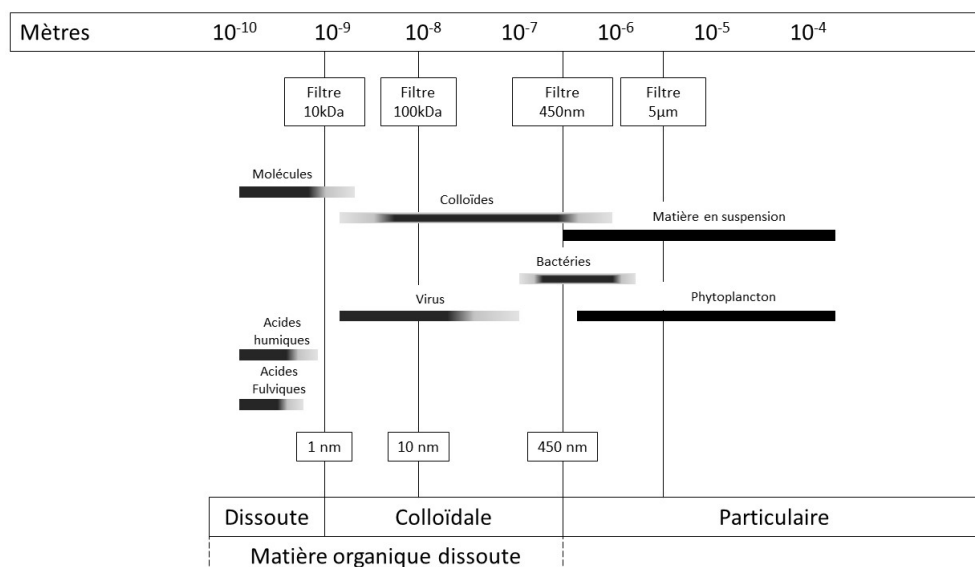


Figure I-4 : Le continuum de taille de la matière organique dissoute dans les environnements aquatiques (d'après Aiken et al. 2011)

La matière organique naturelle (MON) a la particularité d'être en perpétuelle évolution que ce soit dans le temps ou bien dans l'espace selon les paramètres de température, pH, force ionique et également la lumière et les processus microbiens actifs (Leenheer and Croue, 2003). En fonction des propriétés physico-chimiques des molécules de la MOD, il est possible de les classer selon leur solubilité, leur caractère hydrophobe ou hydrophile (Leenheer and Noyes, 1984).

Le Tableau I-1 présente de manière condensée, une partie des substances biologiques naturelles et leurs produits de dégradation, avec une liste abrégée des composés simples communément rencontrés dans les eaux naturelles (Sigg et al., 2014, 2000).

*Tableau I-1: Substances biologiques et leurs produits de dégradation intermédiaires et finaux de la biomasse potentiellement présents dans les milieux aquatiques naturels*

<b>Substances biologiques</b>	<b>Produits intermédiaires de dégradation</b>	<b>Produits intermédiaires et finaux de dégradation</b>
<b>Acide aminés</b> <b>Protéines</b>	Polypeptides => acides aminés => RCOOH, RCH <sub>2</sub> OHCOOH, RC <sub>2</sub> OH, RCH <sub>3</sub> , RCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , CO <sub>2</sub> , HS <sup>-</sup> , CH <sub>4</sub> , peptides, acides aminés, urée, phénols, indoles, acides gras, mercaptans
<b>Lipides</b>	Acides gras + glycérine => RCH <sub>2</sub> OH, RCOOH, RCH <sub>3</sub> , RH	CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , acides aliphatiques, acides acétique, lactique, citrique, glycolique, maléique, stéarique, oléique, hydrocarbures
<b>Glucides</b> Cellulose Amidon Lignine	Monosaccharides, hexoses, polysaccharides, pentoses chitine, glucosamine	CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , glucose, fructose, Galactose, Arabinose, Ribose, Xylose, lignine
<b>Porphyries</b> <b>Pigments végétaux</b> Chlorophylle Hémine Carotène Xanthophylle	Chlorine => Phéophytine => Hydrocarbures	Phytol, pristane, caroténoïdes, isoprénoïdes, acides, alcools, cétones, porphyrines
<b>Acides nucléiques</b>	Polynucléotides => nucléotides	CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , purines, pyrimidines, ribose, désoxyribose
Substances complexes formées à partir des produits intermédiaires	Phénols, quinones, acides aminés => acides aminés et produits de décomposition de glucides	Mélanines + substances humiques <b>Acides humiques, fulviques et tanins</b>



La matière organique dissoute est un continuum hétérogène et complexe de composés/molécules organiques de très haut jusqu'à très faible poids moléculaire, présentant des solubilités et réactivités variées. Il est aujourd'hui connu que des milliers de molécules différentes contribuent à la formation de la MOD dans un échantillon d'eau (Sleighter et al., 2010; Stenson et al., 2003).

La matière organique (MO) est donc un ensemble complexe de macromolécules organiques diverses et variées, provenant de la dégradation des débris/résidus des êtres vivants (animaux et végétaux), de la production primaire dans les eaux naturelles, ainsi que des rejets anthropiques (agriculture, industrie...). Cette définition sépare donc en deux parties la matière organique, d'une part la matière organique naturelle, et d'une autre la matière organique anthropique. De ce fait la MOD présente dans les systèmes aquatiques peut avoir trois origines principales : autochtone, allochtone naturelle et allochtone anthropique (McKnight and Aiken, 1998).

La MO autochtone provient de la dégradation et des excréments de la biomasse algale, des plantes aquatiques, des bactéries en suspension, du macro- et du phytoplancton (Boyd and Osburn, 2004; Henderson et al., 2008; Veyssy, 1998; Wada et al., 2007; Wang et al., 2007; Y. Yamashita and Tanoue, 2004; Zhang et al., 2009b). Dans les océans, les processus microbiens et d'exsudation par le phytoplancton et les bactéries sont les sources majoritaires en MO autochtone (Jiao et al., 2010), alors que dans les eaux douces comme les lacs et rivières 97 % de la production de MO provient des macrophytes et autres végétaux (Søndergaard and Thomas, 2004). La production de MO autochtone est largement influencée par de nombreux facteurs, tels que la présence de phytoplancton et macrophytes dans le milieu, la qualité de l'eau, la température, la présence de nutriments, etc. (Fogg, 1977; Hulatt and Thomas, 2010; Keller and Hood, 2011; Puddu et al., 2003; Rochelle-Newall et al., 2011).

Les sources majeures de MO allochtone naturelle sont les particules provenant de la biosphère terrestre que ce soit des sols ou bien de la dégradation de végétaux des bassins versants (McKnight et al., 2001). La MO provenant des sols (de la roche mère) est liée à la matrice minérale résultant de réactions microbiologiques enzymatiques et/ou physico-chimiques de précipitation, chélation, polycondensation, etc. (Li et al., 1994; Walling, 1983). Cette MO est caractérisée par une forte teneur en substances humiques (acides humiques et fulviques) associées à des structures chimiques très complexes (Søndergaard and Thomas, 2004). La MO allochtone venant de la dégradation des végétaux a la particularité d'avoir une signature différente selon ses régions d'origines (tropicale, tempérée ou boréale), en raison des facteurs physico-chimiques liés aux développements de ces végétaux (climat...), aux conditions de dégradation (processus microbiens...) et à la structure du bassin versant. Ainsi d'une région à une autre, de nombreuses différences peuvent apparaître en termes de MO allochtone qui

de plus diffère énormément d'un point de vue optique et chimique de la MO autochtone (Benner, 2002; Stedmon et al., 2007; Tank et al., 2010).

Les sources de MO allochtone anthropique proviennent majoritairement de l'agriculture, de l'industrie et des rejets de station d'épuration, ainsi que des activités humaines (Leenheer and Croue, 2003; Mostofa et al., 2010). Ces apports anthropiques amènent également un grand nombre de contaminants organiques, tels que les agents de blanchiment, pesticides, produits pharmaceutiques ou autres perfluorés (Botta et al., 2009; Chevreuil et al., 1995; Cruz, 2015; Kuster et al., 2008; Z. Meng et al., 2013; Mostofa et al., 2013; Munoz et al., 2015; Rivera-Utrilla et al., 2013; Verlicchi et al., 2012) associés ou non à la MOD.

La matière organique est donc considérée comme ubiquiste puisque présente dans tous les compartiments : aquatiques (M. Chen et al., 2010; Chin et al., 1998; Lam et al., 2007; Repeta et al., 2002; Rosario-Ortiz et al., 2007; Shon et al., 2006), dans le sol (Akagi et al., 2007; Fellman et al., 2008; Semenov et al., 2013) ainsi que dans les sédiments (Burdige, 2005, 2001; Mayer et al., 2006; Wang and Mulligan, 2006).

La MOD est souvent divisée en deux groupes : les substances humiques et les non-humiques. Les substances humiques, qui peuvent représenter jusqu'à 50 % du COD dans les milieux aquatiques continentaux, sont des composés plus hydrophobes constitués en majorité d'acides humiques et d'acides fulviques. Ce groupe de molécules complexes issues de chaînes de dégradations longues constitue un groupe à part dans les molécules organiques, souvent considéré comme réfractaire et peu biodégradable. Les composés non humiques moins hydrophobes sont, quant à eux, principalement constitués d'acides hydrophiles, de protéines, d'acides aminés et de carbohydrates (Owen et al., 1995). Dans la réalité il est pourtant très difficile de séparer les composés humiques des non-humiques

### *a Substances humiques*

Pendant de très nombreuses années l'étude de la MO s'est limitée à celle des substances humiques. Elles constituent un groupe de molécules aliphatiques et aromatiques complexes, couvrant une très large gamme de compositions chimiques et de tailles de molécules (Matilainen, 2007), parmi lesquelles se trouvent les acides humiques et les acides fulviques. De plus ces substances organiques représentent le premier constituant de la MON dans les sols et entre 40-60% dans les écosystèmes aquatiques continentaux (Abbt-Braun et al., 2004; Aiken, 1985; Senesi, 1993; Sutton and Sposito, 2005). Elles sont issues de processus d'humification qui reposent sur des mécanismes complexes de dégradation de la matière organique par les microorganismes. Elles sont formées dans les sols, les

sédiments et les eaux naturelles par une succession de chaînes réactionnelles impliquant la dégradation des êtres vivants, les rejets microbiens et les apports terrestres. Ainsi la lignine des plantes et ses produits de dégradations, polysaccharides, chitine, mélanine, protéines, lipides, acides nucléiques, sont des composés qui prennent part à ces processus (Figure I-5). Diverses théories coexistent quant à l'origine des substances humiques, impliquant une origine végétale par la dégradation des tissus lignifiés, et une origine microbienne par la décomposition des autres résidus organiques (Flaig, 1960). Les principales voies de synthèse mettent en cause la lignine, les composés phénoliques de diverses origines, les polysaccharides et leur biodégradabilité relative, pour expliquer la formation des substances humiques (Figure I-5). Ces résidus organiques subissent de profondes transformations et ne ressemblent plus à leur structure d'origine.

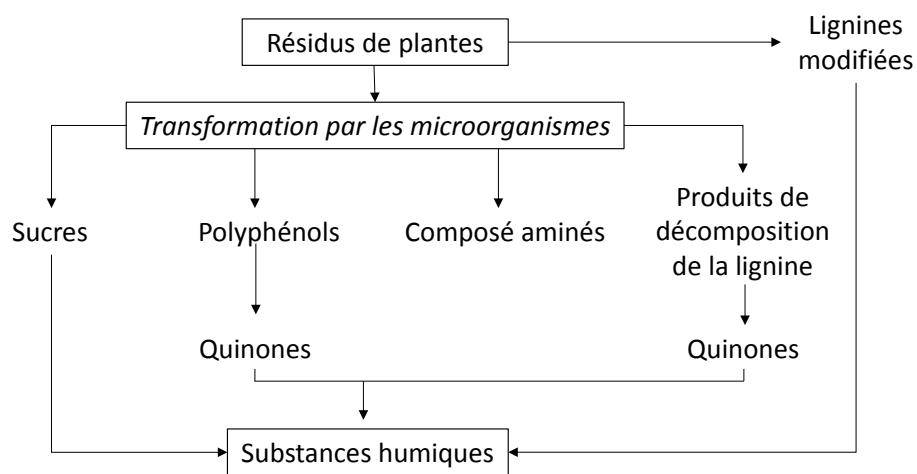


Figure I-5: Mécanismes de formation des substances humiques: "humification" (d'après : Stevenson, 1982)

Etant donné que les substances humiques ont une faible capacité à se biodégrader, elles ont été décrites comme réfractaires (Duursma and Dawson, 1981). En raison de leurs propriétés acido-basiques les substances humiques jouent un rôle primordial dans les eaux naturelles sur les équilibres acido-basiques.

Ainsi ces substances sont généralement divisées en deux catégories majeures dans les eaux, en fonction de leur solubilité (Aiken, 1985) :

- Les acides fulviques (AF) : cette fraction est soluble quel que soit le pH
- Les acides humiques (AH) : cette fraction n'est soluble qu'à un pH alcalin mais précipitée à un pH inférieur à 2

Les AH et AF sont issues d'une procédure conventionnelle de séparation (protocole de l'International Humic Substances Society (IHSS)). Il s'agit donc de définitions opérationnelles qui ne sont pas liées à des caractéristiques fonctionnelles ou structurales particulières. Ces fractions sont donc constituées de mélanges d'espèces différentes mais proches par certaines propriétés dont la solubilité.

Généralement ces composés sont décrits à l'aide de leur teneur en carbone, quantité de groupements carboxylique, poids moléculaire, rapports des éléments (O/C, C/H, C/N,...) degré d'aromaticité... (Tableau I-3). Elles sont caractérisées par une grande variété de groupements chimiques fonctionnels notamment des acides carboxyliques, des hydroxy-phénols et des groupes carboxyles et hydroxyles.

Il existe une analogie entre la structure des AF et des AH, et à partir de l'étude de leurs propriétés physico-chimiques (masse molaire, composition élémentaire, présence et distribution des groupements fonctionnels), il a été démontré qu'il n'existe pas de séparation bien nette entre ces deux catégories de MO. Cependant l'IHSS divise bien les substances humiques présentes dans les écosystèmes aquatiques en acides humiques et acides fulviques. En termes de structures moléculaires, les acides humiques ont plus de groupements carbonyles (-COOH), phénoliques (- $\phi$ -OH) liés ou libres, de fonctions basiques, hydroxyques et sulfurées, d'acides aminés aromatiques et de doubles liaisons nitrogène et oxygène (Tableau I-3). La présence de carbone (C) et d'azote (N) est plus élevée dans les acides humiques. Les acides fulviques eux contiennent une plus grande proportion de groupements carboxyles, des structures aromatiques et aliphatiques accompagnées de liaisons oxygènes avec des groupements fonctionnels (Alvarez-Puebla et al., 2006; Thurman and Malcolm, 1981) et une proportion d'oxygène (O) plus élevée (Tableau I-2). Le rapport O/C permet de différencier les acides humiques, O/C = 0,5, des acides fulviques, O/C = 0,7. De plus en général les acides humiques ont des tailles moyennes moléculaires plus grandes que les acides fulviques.

Tableau I-2: Composition élémentaire des substances humiques en % d'après Stevenson (1982)

<i>Eléments</i>	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>H</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
<i>Acides humiques</i>	40-50	44-50	4-6	<1-3	0-2
<i>Acides fulviques</i>	50-60	30-35	4-6	2-6	0-2

En termes de structures, malgré de nombreuses études descriptives (Ghosh and Schnitzer, 1980; Schnitzer and Khan, 1972; Schulten and Schnitzer, 1997; Stevenson, 1999, 1982), les substances humiques restent encore mal définies, et il est impossible de les représenter sous une formule moléculaire. Parmi les modèles proposés, celui de Stevenson (1982) représente les acides humiques comme des macromolécules aromatiques complexes (Figure I-6), dans lesquelles les groupes aromatiques sont substitués par des composés aliphatiques et les liaisons de peptide et de sucres aminés expliquent la présence de l'azote dans ce genre de structures.

Tableau I-3 : Propriétés des substances humiques références de l'IHSS

<i>Substances humiques</i>	<i>Cat. No.</i>	<i>Carbonyl 220-190 ppm</i>	<i>Carboxyl 190-165 ppm</i>	<i>Aromatic 165-110 ppm</i>	<i>Acetal 110- 90 ppm</i>	<i>Heteroaliphatic 90-60 ppm</i>	<i>Aliphatic 60-0 ppm</i>	<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>Ash</i>	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>P</i>	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
<b>Standard AH</b>																	
<i>Suwannee River</i>	1S101H	8	19	37	9	7	21	10	3,1	52,6	4,4	42,5	1,2	0,6	<0,01	-28	-1,4
<b>Standard AF</b>																	
<i>Suwannee River</i>	1S101F	7	20	24	5	11	33	8,8	0,5	52,4	4,3	42,2	0,7	0,4	<0,01	-28	-1,9
<i>Pahokee Peat</i>	1S103F	7	28	34	3	9	20	12	4,6	50,5	3,5	45,5	2,6	0,7	0,02	-26	1,42
<b>Reference HA</b>																	
<i>Suwannee River</i>	1R101H	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,8	3,5	52,9	4,1	43,4	1,2	0,6	<0,01	-28	-2,4
<i>Pahokee Peat</i>	1R103H	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10	1,7	56,8	3,6	36,6	3,7	0,7	0,03	-26	1,43
<i>Nordic Lake</i>	1R105H	10	19	38	7	11	15	9,1	0,3	53,3	4	43,1	1,2	0,6	0,01	-28	-1,6
<b>Reference AF</b>																	
<i>Suwannee River</i>	1R101F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,9	1	53	4,4	43,9	0,8	0,5	<0,01	-28	-2,8
<i>Pahokee Peat</i>	1R103F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12	1,6	52,1	3,2	43,9	2,4	0,5	0,01	-26	0,98
<i>Nordic Lake</i>	1R105F	10	24	31	7	12	18	9,2	0,5	52,3	4	45,1	0,7	0,5	<0,01	-28	-3,2
<b>NOM aquatique</b>																	
<i>Suwannee River</i>	1R101N	8	20	23	7	15	27	8,2	7	52,5	4,2	42,7	1,1	0,7	0,02	nd	nd
<i>Nordic Lake</i>	1R108N	8	21	19	5	16	31	nd	41	53,2	5,7	nd	1,1	nd	nd	nd	nd
<i>Upper Mississippi R</i>	1S110N	3	14	19	7	20	37	8,6	8,1	50	4,6	41,4	2,4	2,6	nd	nd	nd

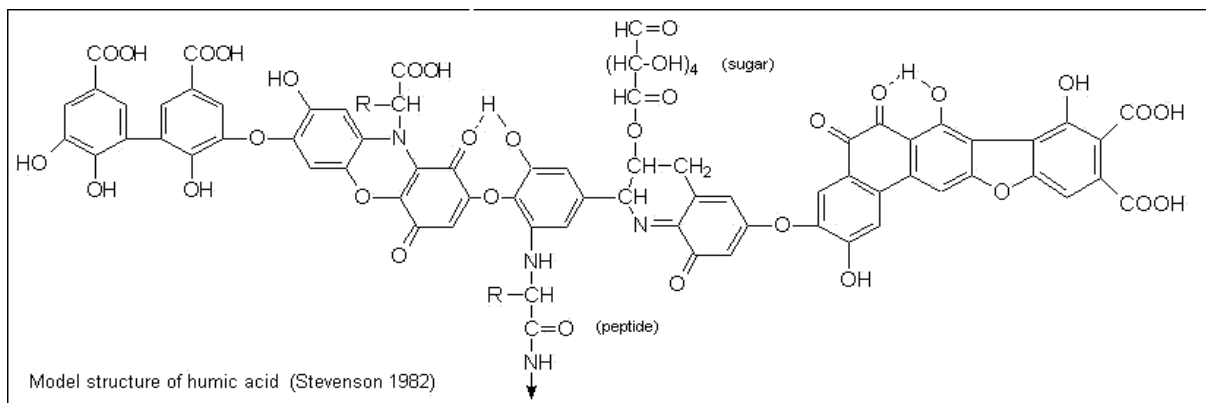


Figure I-6: Modèle de substances humiques d'après Stevenson (1982)

Les modèles hypothétiques de Buffle (1988) et Alvarez-Puebla et al.(2006) représentent un acide fulvique contenant des structures aromatiques et aliphatiques fortement substituées par des groupements fonctionnels (Figure I-7 et Figure I-8).

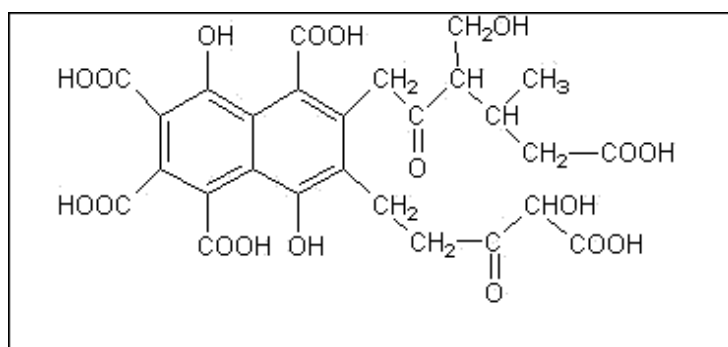


Figure I-7: Modèle d'acide fulvique selon Buffle (1988)

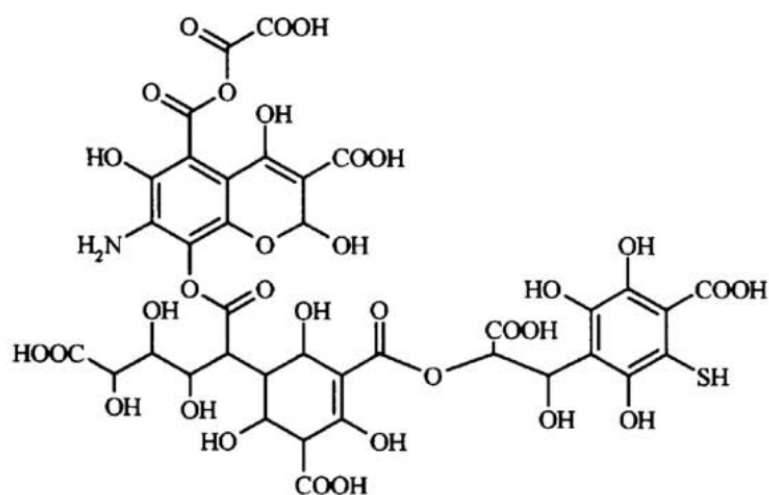


Figure I-8: Modèle d'acide fulvique selon Alvarez-Puebla et al., 2006

L'étude des acides humiques et fulviques provenant des écosystèmes aquatiques se fait généralement par acidification à pH 2,8-3,0 puis par adsorption sur colonne de résines (Leenheer and

Croue, 2003; Thurman and Malcolm, 1981). Cette extraction sur résines constitue le protocole reconnu par l'IHSS.

Dans les environnements aquatiques, les substances humiques sont principalement représentées par les acides fulviques. Et la proportion s'accroît encore plus dans les eaux marines avec plus de 85% d'acides fulviques pour 15% d'acides humiques provenant de la décomposition du phytoplancton (Figure I-1) (E.M. Thurman, 1985). Dans les eaux douces, fleuves, rivières et ruisseaux, les substances humiques peuvent représenter entre 20-85% de la MOD totale, avec entre 15-80% d'acides fulviques, et entre 5-29% d'acides humiques. Et dans les lacs la part des substances humiques dans la MOD est de 14 à 90%, avec entre 14-70% pour les acides fulviques et autour de 0-22% pour les acides humiques.

### *b Les substances non-humiques*

Les substances non-humiques correspondent à la fraction de la MO qui n'est pas retenue sur une colonne de résine (XAD-8) lors d'une extraction de MOD (Leenheer, 1981; Thurman and Malcolm, 1981). La composition de cette fraction reste encore largement mal-connue cependant il est possible d'y inclure les acides hydrophiles, les protéines, les acides aminés, les sucres aminés et les glucides. Ainsi dans les eaux douces, les glucides et les sucres aminés dominent la distribution en carbone organique de la fraction non-humique (Croué, 2004).

#### *i Glucides*

Les glucides sont les composés les plus fréquemment utilisés par les bactéries hétérotrophes (pour leur énergie et leur croissance) dans les environnements aquatiques (Hedges et al., 1994; Kirchman and Borch, 2003). De plus, ils participent au contrôle de la biodisponibilité du fer dans les océans (Hassler et al., 2011). Principalement produits par la production primaire du phytoplancton dans les environnements marins, ces glucides que ce soient les polymères ou les monomères (monosaccharides et disaccharides) peuvent constituer une part importante du COD dans les milieux aquatiques avec entre 10-30% du COD dans les rivières/fleuves et zones côtières et marines (Benner et al., 1992; Pakulski and Benner, 1994). Etant donné que les glucides sont des molécules importantes pour le métabolisme énergétique et structural des plantes terrestres et aquatiques, ils peuvent donc prendre une part conséquente dans la MOD des fleuves et estuaires.

Ce groupe de molécules est principalement composé de polysaccharides (70-94%) (Biddanda and Benner, 1997) et majoritairement des arabinoses et mannoses (McKnight et al., 1985).

## ii Protéines et acides aminés

Les matières protéiques dissoutes (appelées aussi acides aminés hydrolysables) et leurs acides aminés libres dissous précurseurs et acides aminés combinés ou polypeptides, sont généralement considérés comme le deuxième contributeur de COD dans les eaux continentales. Ils sont produits et excrétés sous forme libre notamment en prenant part à des polymères de peptides ou de protéines (Münster, 1999). Les acides aminés représentent une des principales sources d'azote pour les microorganismes dans de nombreux écosystèmes aquatiques sous forme d'azote organique dissous (Bushaw, 1996). Ils dérivent principalement des dégradations enzymatiques des bactéries de matières protéiques particulaires et dissoutes, et par excrétion par des organismes phytoplanctoniques (Münster, 1999; Münster and Chróst, 1990). Les principaux contributeurs en acides aminés et protéines sont l'acide glutamique, la glycine, la sérine et l'acide aspartique (Hedges et al., 1994; Lara et al., 1998; E M Thurman, 1985).

Les acides aminés et protéines sont considérés comme de grands pourvoyeurs de carbone organique pour beaucoup d'organismes marins (Cowie and Hedges, 1994). L'ensemble des acides aminés et protéines dissous contribuent à hauteur de 2 à 5% du COD pour les eaux de surface (Ogawa et al., 2003; E M Thurman, 1985).

De plus la compréhension des sources, de la biodisponibilité et de la dynamique environnementale de l'azote organique dissous est cruciale afin de mieux comprendre les processus biogéochimiques dans les environnements aquatiques.

## iii Lipides

Les lipides sont considérés comme un large éventail de composés (principalement dominés par les hydrocarbures, les acides gras, les alcanes et les stérols) qui peuvent prendre une part plus ou moins grande dans la MO. Ils peuvent être utilisés comme des biomarqueurs de source et d'évolution de la MO. Les lipides sont toujours trouvés en concentration beaucoup moins importante que les glucides et les protéines dans le carbone organique dissous et particulaire (COD et COP) (Harvey and Mannino, 2001). Malgré cela des études ont montré des différences significatives dans la distribution des lipides entre les phases dissoutes et particulaires. Ainsi, ceci suggère que les sources et la formation du matériel lipidique dans les eaux naturelles peuvent être fondamentalement différentes (Aluwihare et al., 2002; Hwang and Druffel, 2003; Loh et al., 2008, 2004; Wakeham et al., 1997).

De plus dans des zones urbanisées et/ou industrialisées, les stations d'épuration et réseaux d'assainissement peuvent être des sources d'enrichissement, des milieux naturels, en lipides spécifiques comme certains stérols caractéristiques, et donc les apports anthropiques peuvent être



considérés comme potentiellement significatifs sur les flux de COD (Dignac et al., 2000; Réveillé et al., 2003).

Finalement il est bon de noter que les processus physiques tels que la solubilisation, l'adsorption/désorption sont aussi importants dans le contrôle de la répartition des lipides dans la MOD totale.

#### iv Lignine

La lignine est un composé faisant partie des biomasses lignocellulosiques constituées de cellulose, d'hémicellulose et donc de la lignine. Cette dernière est le principal constituant des plantes supérieures et de certaines algues notamment dans les parois cellulaires. Sa composition est différente selon les espèces végétales mais conserve une structure de polymère aromatique, souvent amorphe et hydrophobe (Figure I-9). Sa structure hétéro-polymérique la rend difficilement biominéralisable et donc lui confère un caractère réfractaire (Dittmar and Lara, 2001).

La lignine et ses dérivés sont des traceurs de la MO provenant des plantes terrestres. Elle est régulièrement utilisée comme un biomarqueur des sources et des devenir de la MOD terrigène (Dittmar and Lara, 2001; Goni and Hedges, 1995; Robert G M Spencer et al., 2009; Wakeham and Lee, 1989) notamment afin de mieux comprendre le cycle de la MOD terrestre et son impact sur les océans (Hernes and Benner, 2002). La caractérisation de sa composition permet une distinction chimio-taxinomique des plantes supérieures (angiospermes, gymnospermes,...) (Dittmar and Lara, 2001; Hedges and Mann, 1979).

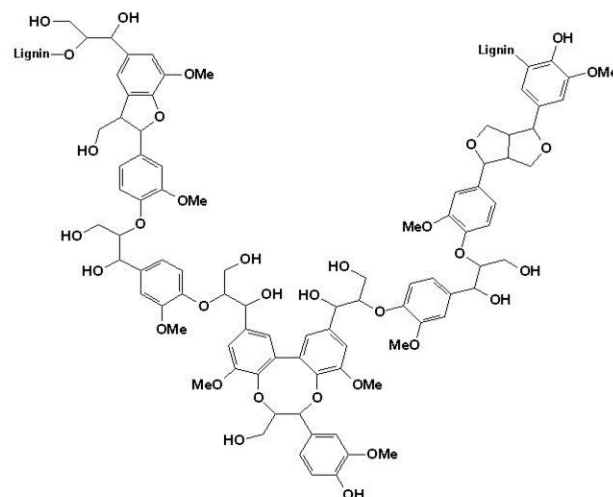


Figure I-9: Structure modèle de la lignine

La composition de la MOD est donc complexe et encore mal connue. Malgré cela, il est possible d’imaginer un diagramme de composition conceptuel d’un échantillon d’eau de rivière en se basant sur des schémas de séparations spécifiques des grandes classes chimiques (Aiken, 1985; Aiken et al., 1992; Thurman and Malcolm, 1981). Dans ce cas, la fraction dominante de la MOD est l’acide fulvique suivis par les acides de faibles poids moléculaire et les bases (Figure I-10).

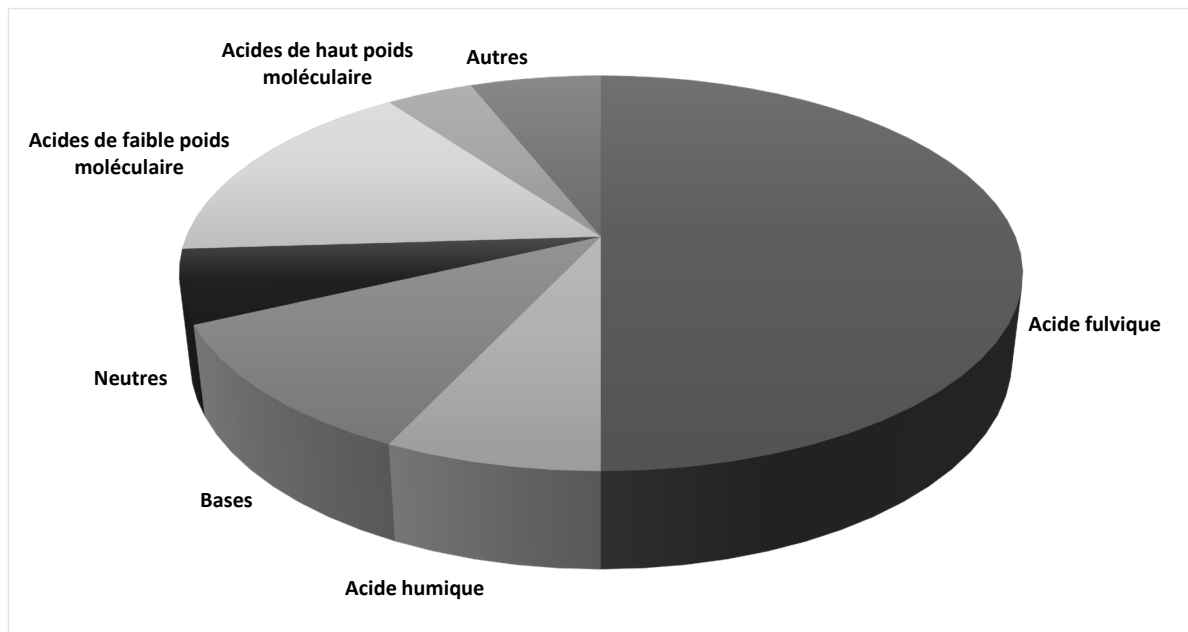


Figure I-10: Diagramme de distribution des classes chimiques composant la MOD dans un échantillon typique de rivière à 5mg C.L<sup>-1</sup> (adapté de Thurman 1985)

### *c Sources anthropiques de la MOD*

Les sources anthropiques de MOD sont principalement l’agriculture, l’industrie et les effluents de réseaux et stations d’épuration qui proviennent des activités humaines (Figure 0-11; Filella, 2009; Mostofa et al., 2013; Sharma et al., 2011). Ces activités anthropiques sont donc des sources de MOD spécifiques et également de contaminations organiques ou inorganiques tels que les pesticides, les substances pharmaceutiques, les hormones ou les métaux et nanoparticules (Aminot, 2013; Cruz, 2015; F. Meng et al., 2013; Mostofa et al., 2013).

La présence de zones très urbanisées, cultivées et urbanisées affecte la quantité et la composition de la matière organique dans les fleuves et les rivières à travers les différents effluents. Cette matière organique d’effluents montre une plus grande variabilité de composition et est très dépendante des processus de traitement des eaux (J. Guo et al., 2011; Sharma et al., 2011). Les apports anthropiques tels que les évacuations des eaux usées et les sources ponctuelles peuvent affecter la quantité et la qualité de la MOD et ainsi la concentration en COD dans les rivières. Les conséquences pour

l'environnement des différentes sources et apports sont encore mal connues, ainsi que les impacts sur les cycles biogéochimiques ou sur l'écologie des milieux aquatiques. Cependant il est important de discriminer la MO naturelle et la MO anthropique car la dégradabilité est dépendante de la composition de la MO et donc des sources (Sharma et al., 2011). La dégradation est un processus important car il va directement influencer la réactivité de la MO et ainsi ses interactions avec les autres constituants du milieu voir donc avec les contaminants.

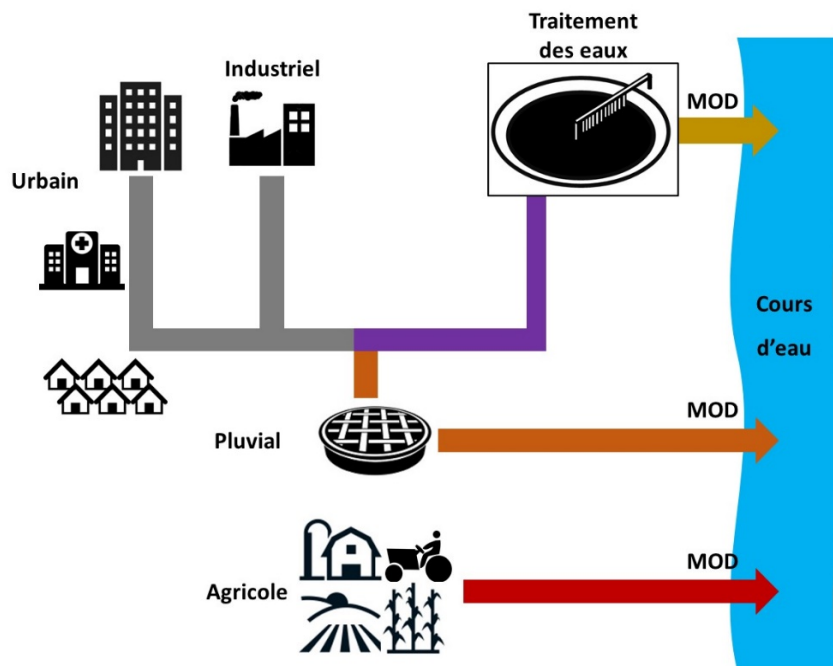


Figure I-11: Schéma des sources d'apport anthropique en MOD pour les milieux aquatiques

## 5 Facteurs contrôlant la MOD

La concentration, la composition, la structure et la réactivité de la MOD dans les environnements aquatiques naturels sont influencées par un nombre important de facteurs incluant tout d'abord la nature des sources de matériels et les processus biogéochimiques (Figure I-12) associés au cycle du carbone notamment avec les bassins versants terrestres (Aiken and Cotsaris, 1995; McKnight and Aiken, 1998). Ces facteurs peuvent aussi être influencés par d'autres tels que la dynamique hydrologique, le climat et les politiques de gestion des eaux et l'agriculture. De plus les choix de gestion des eaux domestiques, industrielles et autres, associés aux changements climatiques rentrent pleinement dans l'intérêt d'une meilleure compréhension des facteurs influençant la dynamique de la MOD. Car *in fine* cela concerne directement la qualité des ressources en eau potable, les transferts de métaux et de composés organiques anthropiques comme les pesticides ou pharmaceutiques, dans les

environnements naturels et donc les effets et impacts sur les écosystèmes fluviaux, estuariens, côtiers et enfin marins.

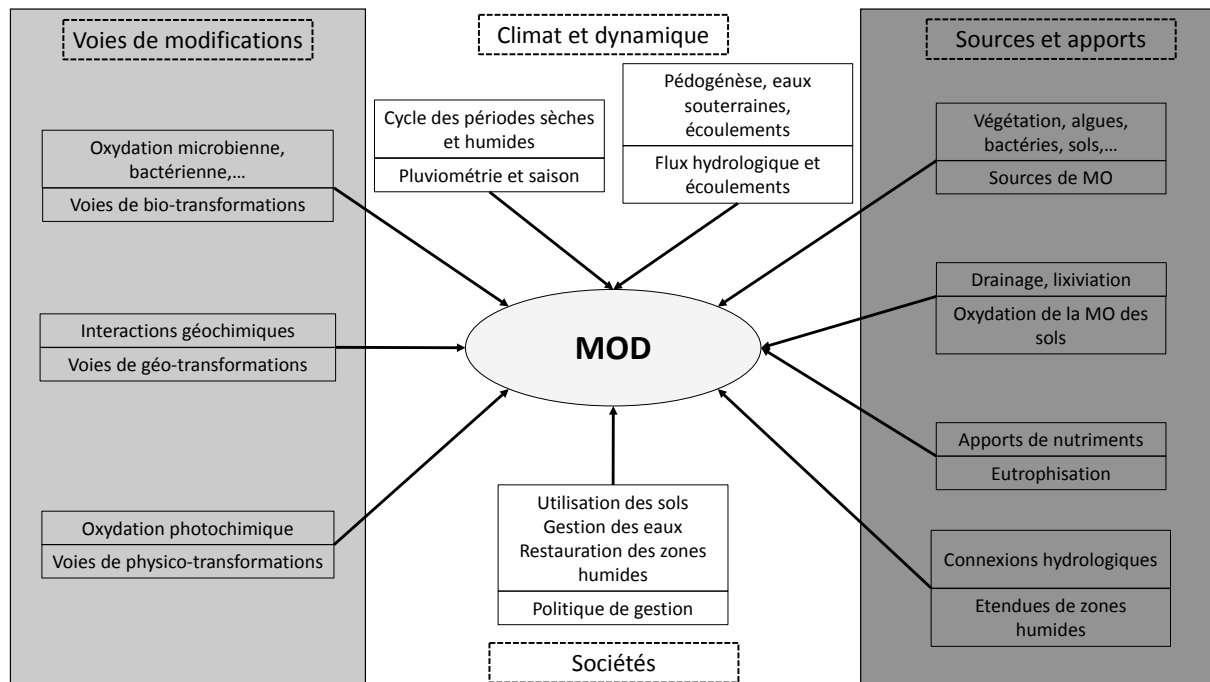


Figure I-12: Schéma conceptuel illustrant les facteurs importants contrôlant les concentrations, compositions, structures de la MOD dans les écosystèmes aquatiques (inspiré de Aiken et al., 2011)

Tout d'abord le carbone est incorporé dans la biomasse des plantes supérieures grâce à la photosynthèse qui est la première étape du cycle du carbone. La matière organique est donc dans un premier temps sous forme de plantes, de microorganismes aquatiques ou terrestres, de résidus de dégradations, de sols, de sédiments et de MOD. En plus des sources naturelles, il y a aussi les sources anthropiques, les lixiviats diverses (Cozzarelli et al., 2011), les huiles dégradées (Natter et al., 2012) et la matière organique des réseaux et stations d'épuration (Baker, 2001).

Les caractéristiques chimiques de la MOD sont influencées par les processus biogéochimiques comme la lixiviation, l'action du métabolisme microbien, des altérations géochimiques dues à des réactions d'adsorption/désorption/sorption et des interactions avec d'autres composés inorganiques tels que les métaux (McKnight et al., 1992; Riedel et al., 2012), l'ammonium et les amines (Thorn and Kennedy, 2002; Thorn and Mikita, 1992), ou avec des sulfites (Einsiedl et al., 2008; Urban et al., 1999), et également des réactions de photo-oxydations (Brooks et al., 2007; Hernes and Benner, 2003; Osburn et al., 2001). Ces processus sont eux influencés par la nature de la MO et ses sources, les nutriments biodisponibles, l'état d'oxydo-réduction, ou bien le système hydrologique.

Les interactions et interconnexions entre l'ensemble de ces facteurs et les processus sont compliquées et difficiles à mesurer. Elles ont de plus de très grandes influences sur la production primaire.

### *a Contrôle microbien*

La lixiviation des composés organiques des plantes est un des processus primordiaux dans la production de MOD. Ces composés organiques sont en effet les précurseurs de l'activité microbienne (Findlay and Sinsabaugh, 2003). Il a été démontré qu'une grande partie de la MOD provenant de la lixiviation est particulièrement labile et rapidement utilisable par les micro-organismes (Benner et al., 1986; Davis III et al., 2006; Hur et al., 2009; Maie et al., 2006b). En plus de l'action de lixiviation, la dégradation microbienne sur les composés organiques dans les sols, les sédiments et les eaux amènent à la formation de très nombreuses molécules de la MOD. Sa composition et sa structure sont contrôlées par différents facteurs qui influencent la structure et l'activité microbienne.

### *b Contrôle hydrologique*

L'hydrologie au sens large exerce un très fort contrôle sur la MOD en termes de transport et d'évolution. Par exemple la profondeur d'eau joue un rôle crucial sur le statut redox du milieu. L'hydrologie contrôle les flux de MOD depuis les écosystèmes terrestres vers les milieux aquatiques. L'eau est donc comme le solvant et la phase mobile de la MOD qui relie les environnements terrestres aux milieux aquatiques. Ainsi dans de nombreuses rivières ou zones humides, la concentration et la composition de la MOD varient selon les facteurs hydrologiques (Aiken and Cotlaris, 1995; Sebestyen et al., 2008; Spencer et al., 2012). De fortes corrélations existent entre la concentration et composition de la MOD et les débits des fleuves, rivières ou ruisseaux qui reflètent différentes sources. De plus les précipitations de par leur composition chimique associée à leur pH et force ionique ont été identifiées comme des facteurs jouant un rôle dans l'exportation de MOD des sols vers les systèmes aquatiques.

### *c Photochimie*

Les interactions de la MOD avec les rayons lumineux solaires sont à la base de très nombreuses réactions à la surface de la Terre. En premier lieu, l'énergie absorbée par les molécules organiques est ensuite dissipée par différentes voies telles que la fluorescence, la formation d'intermédiaires de réaction ou bien des transformations oxydatives. L'absorption de lumière par une molécule peut amener à une photolyse directe entraînant la formation de produits d'oxydation, ou indirecte par transformation avec une molécule excitée. Ces réactions peuvent chimiquement transformer les molécules de MOD influençant donc leur composition et leur concentration (Osburn et al., 2001;

Schmitt-Kopplin et al., 1998). Les réactions de photochimie vont également jouer un rôle dans le cycle du carbone par des productions photochimiques de composés organiques volatiles de faibles masses moléculaires (Kieber et al., 1990), CO<sub>2</sub> et CO (Miller and Zepp, 1995; Stubbins et al., 2008).

## 6 Interactions MOD-contaminants

### *a Interactions avec les métaux et les colloïdes métalliques*

La MOD interagit sur de nombreux aspects (transformation, transport...) de la géochimie des minéraux. Elle joue un rôle primordial de ligand pour les métaux dissous. De ce fait elle influence la formation de nano-colloïdes inorganique/organique et contrôle la biodisponibilité des formes dissoutes et colloïdales des métaux dans l'environnement (Aiken et al., 2011).

Il est nécessaire de mieux comprendre les structures, compositions et évolutions de la MOD associées avec ses interactions avec les métaux et colloïdes minéraux, afin de mieux appréhender et définir les facteurs environnementaux régissant la biodisponibilité et la réactivité des métaux. Ceci notamment dans le but de mieux penser les enjeux sociétaux autour de la gestion de l'eau et des ressources, pour limiter par exemple les effets des polluants comme le mercure (Hg) ou le cuivre (Cu) ou bien de mieux comprendre les effets et devenir des nanoparticules métalliques manufacturées (en termes de conséquences sur la santé humaine ou écologique) (Aiken et al., 2011; Auffan et al., 2009; Bottero et al., 2011; Buffle et al., 2009; Levard et al., 2012; Lowry et al., 2012).

Actuellement, les liaisons entre MOD et métaux sont encore mal définies et comprises dans des conditions environnementales (en termes de concentration de métaux, de MOD et de conditions physico-chimiques). Il est connu que la MOD contient des groupes fonctionnels avec des liaisons métalliques (tels que les glucides, phénols, amines et thiols) avec des affinités et concentrations spécifiques selon les composés et conditions. Les avancées sur la détermination des liaisons MOD-métaux et la nature des sites spécifiques de liaisons chimiques, ont montré l'intérêt de certains groupements fonctionnels présents en faible abondance (notamment avec de l'azote (N) et du soufre (S) comme les thiols et les sulfures organiques) dans les interactions avec certains métaux traces (ElBishlawi and Jaffe, 2015; Mangal and Guéguen, 2015; Schartup et al., 2015; Settimo et al., 2015).

La MOD peut d'autre part altérer et modifier les relations entre les métaux et les ligands inorganiques, en influençant plus spécifiquement les réactions cinétiques amenant à la formation de colloïdes inorganiques. Elle peut aussi influencer les processus de précipitation de minéraux (Deonarine et al., 2011; Deonarine and Hsu-Kim, 2009; Hoch et al., 2000; Lin et al., 2005). Il a été également montré que la MOD peut jouer sur la biodisponibilité du mercure (Hg) dans des conditions environnementales et en présence de soufre. Dans ce cas, la MOD va réduire la croissance de nanoparticules de Mercure

associées au soufre, au profit d'une plus grande biodisponibilité du mercure en étant associée à la MOD (Figure 0-13; Graham et al., 2012; Miller et al., 2007).

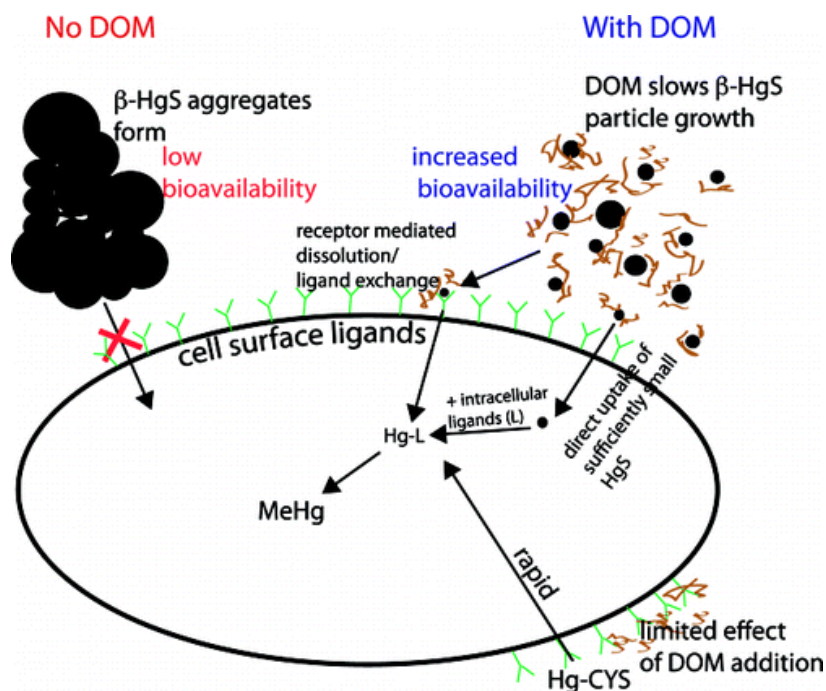


Figure I-13: Rôle de la MOD dans le contrôle de la biodisponibilité du mercure dans la méthylation bactérienne avec ou sans présence de soufre (inspiré de Graham et al., 2012)

### *b Interactions avec les nanomatériaux*

Les interactions entre la MOD et les nanoparticules inorganiques manufacturées peuvent modifier leurs effets et leurs impacts sur la santé des écosystèmes et des humains (Aiken et al., 2011; Lowry et al., 2012). Les effets de la MOD sur le transport, la réactivité et l'impact de ces nanomatériaux représentent un nouveau champ de recherche associé à de nouveaux défis analytiques et écotoxicologiques (Delay and Frimmel, 2012). Un des principaux problèmes de recherche est le fait que ces nanoparticules manufacturées ont des analogues inorganiques naturels (fer (Fe), argent (Ag) et or (Au)), métaux oxydés (dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), oxyde de zinc (ZnO)), etc.

Les modifications chimiques et de cinétique d'agrégation, de dépôt et de dissolution des nanoparticules engendrées par la MOD doivent être mieux comprises aujourd'hui notamment dans le cadre de scénarios de pollution, où la MOD est dans des concentrations bien supérieures à celles de nanoparticules, et où par exemple il a été montré que les substances humiques aquatiques peuvent augmenter la stabilité aqueuse de nanoparticules d'or (Stankus et al., 2010) ou du dioxyde de titane (Domingos et al., 2009; Thio et al., 2011) ou bien améliorer le transport en phase aqueuse du dioxyde de titane (Chen et al., 2012).

### *c Interactions avec les contaminants organiques*

La MOD interagit également avec les contaminants organiques en améliorant leurs solubilités apparentes, ou bien en modifiant des processus comme les échanges entre les milieux air-eau, la répartition et la sorption entre les sols et le sédiment, et bien sûr la biodisponibilité (Schwarzenbach et al., 2005). De plus la MOD peut modifier la photochimie, l'oxydo-réduction, les réactions d'hydrolyse.

Les caractéristiques chimiques des polluants organiques (structures, solubilités, groupements fonctionnels, etc.) ont un rôle primordial dans leur comportement et leur impact dans les environnements aquatiques. Il est donc capital de mieux comprendre comment la MOD peut modifier la chimie des contaminants. Selon la nature de la MOD (la taille moléculaire, le type, le degré d'aromaticité...), l'influence sur les polluants organiques est plus ou moins grandes (Niederer et al., 2007). Les effets des différentes sources de MOD (naturelles ou anthropiques) ne sont pas encore bien définis ; la MOD de station d'épuration ayant un degré d'aromaticité et une taille moléculaire plus faibles pourrait être moins réactive que la MOD naturelle (Neale et al., 2011).

L'étude des influences de la MOD sur le comportement et les effets des contaminants émergents représente un nouveau champ de recherche, que ce soit en chimie analytique pour la recherche de ces nouveaux contaminants, ou bien pour l'étude plus précise de la MOD, ou encore en écotoxicologie. Parmi ces contaminants, les nanomatériaux organiques comme les fullerènes (nC60) ou les nanotubes de carbone sont connus pour avoir des effets sur la santé humaine et écologique des écosystèmes aquatiques (Dhawan et al., 2006; Di et al., 2016; Hyung and Kim, 2008; Lovern et al., 2007; Mashayekhi et al., 2012).

Les interactions de la MOD avec les contaminants organiques peuvent avoir un contrôle critique sur le transport, la biodisponibilité et le comportement de ces polluants.

Ainsi la MOD dans les milieux aquatiques naturels est ubiquiste en raison des sources potentielles très diverses et de la multitude de processus qui peuvent l'influencer et la modifier. Elle possède des caractéristiques et propriétés bien différentes en fonction de son origine et de son stade de dégradation. Il est très important de prendre l'ensemble de ces informations en compte afin de mieux comprendre son évolution et sa dynamique. A l'heure actuelle un des enjeux est de mieux caractériser la MOD et plus particulièrement sa taille, qui, entre autres, conditionne les phénomènes d'interaction avec les contaminants notamment.



## II Analyse et caractérisation de la matière organique dissoute

La première partie de ce chapitre a permis de mettre en évidence l'omniprésence, l'extrême diversité et surtout le rôle majeur et indispensable de la matière organique dans les environnements aquatiques naturels. Dans cette deuxième partie, les principaux outils d'investigation de la MOD sont présentés. Compte tenu de l'objectif principal de cette thèse, qui est le développement de méthodes pour le fractionnement et la caractérisation de la MOD dans les écosystèmes aquatiques naturels, nous nous sommes plus spécifiquement attachés aux techniques de séparation, analyse et caractérisation de la MOD aquatique.

### 1 Défis analytiques

La caractérisation de la matière organique dissoute et colloïdale en milieux naturels représente un enjeu dans de nombreuses branches de recherche (chimie environnementale, des contaminants, écologie, biologie...). Le développement de méthodes et techniques de caractérisation structurale et moléculaire est ainsi nécessaire pour mieux comprendre le rôle et le devenir de la MOD (mobilité, biodisponibilité), ainsi que la réactivité de ces éléments ou espèces chimiques dans le milieu naturel. Les procédures de développement et d'optimisation de méthodes analytiques sont donc primordiales. Dans l'environnement, la complexité des démarches analytiques vient de l'extrême diversité et complexité de la MOD associée aux faibles concentrations en milieux aquatiques. Le couplage de différentes techniques afin de recueillir le plus grand nombre d'informations permet de pallier à ces difficultés analytiques. En effet la caractérisation détaillée en utilisant une combinaison de techniques permet d'obtenir des informations complémentaires sur les propriétés de la MOD (taille, concentration, conformation, composition, etc.).

### 1 Méthodes d'analyse et de caractérisation

Différentes méthodes et techniques sont utilisées pour la caractérisation de la MOD. Certaines peuvent être appliquées à l'échantillon global, alors que d'autres sont réalisées sur une fraction de l'échantillon. Dans ce dernier cas, l'objectif est souvent de faire la liaison entre la taille moléculaire et les caractéristiques structurales, fonctionnelles et moléculaires. Le terme fractionnement détermine en effet souvent le fait de séparer selon la taille ou la masse molaire. Ainsi deux grands types de techniques sont mises en œuvre : les techniques de séparation/fractionnement et les techniques de détection/caractérisation. Les principales techniques de séparation et caractérisation sont présentées dans le Tableau I-4.

Tableau I-4: Principales techniques de séparation/fractionnement et détection/caractérisation utilisées pour l'étude de la MOD (les zones grisées correspondant aux techniques potentiellement utilisables en couplage)

Méthodes	Caractéristiques du fractionnement / Propriétés mesurées	Limitations
<b>Principales techniques de séparation / fractionnement</b>		
Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	Masse molaire	Perte de l'échantillon et interactions avec la phase
Fractionnement par couplage flux/force (FFF)	Coefficient de diffusion, masse molaire et distribution en taille	Perte de l'échantillon sur et à travers la membrane
Electrophorèse capillaire (CE)	Mobilité électrophorétique	Problèmes adsorption, agrégation
Techniques de sédimentation centrifuge	Distribution en taille à partir de la vitesse de sédimentation et des gradients de diffusion générés par les forces	Erreurs dues aux différences de formes et de densité
Filtrations séquentielles et tangentielles	Distribution en taille, enrichissement de fractions	Erreurs dues à la filtration (encrassement des filtres et faible résolution)
<b>Principales techniques de détection / caractérisation</b>		
UV	Estimation des substances organiques dissoutes et colloïdales	Seulement pour les chromophores Signal dépendant de la concentration et du coefficient d'extinction
Fluorescence	Détermination du type de molécules, origines	Seulement pour les fluorophores Signal dépendant de la concentration et du coefficient d'extinction
Diffusion de lumière	Taille des colloïdes, coefficient de diffusion, potentiel Zêta	Signal dominé par les molécules de grandes tailles, inefficace pour les solutions polydisperses
Techniques de microscopie	Nombre de particules, taille et morphologie	Méthode longue, chère, limité à une taille minimale
Résonance magnétique nucléaire	Caractérisation structurale	Complexe pour les solutions polydisperses et des concentrations faibles nécessitant une étape d'extraction préalable
Spectrométrie de masse	Masse moléculaire, formule chimique	Méthode chère nécessitant une étape d'extraction préalable

## *a Détection / caractérisation selon les propriétés optiques de la*

### *MOD*

Les propriétés optiques de la MOD dépendent de ses sources et de son état de dégradation (évolution). Elles permettent d'avoir des informations sur le type de matériel présent et sur les caractéristiques chimiques globales d'un échantillon. Ainsi les propriétés optiques de la MOD dépendent du type d'apports (forestiers, zones humides, urbain, agricoles...). Les propriétés optiques de la MOD sont donc utilisées comme traceurs des masses d'eaux.

Depuis de nombreuses années, les fractions de la MOD capable d'absorber la lumière ont été largement étudiées à l'aide de techniques optiques, spectrophotométrie et spectrofluorimétrie notamment. L'application de ces techniques a permis de distinguer deux fractions. La fraction de la MOD qui absorbe à la fois dans les ultraviolets et le visible (UV/Vis ; 200-800nm) est appelée matière organique colorée ou chromophorique (MODC), alors que celle qui fluoresce est appelé matière organique fluorescente (MODF) (Figure I-14).

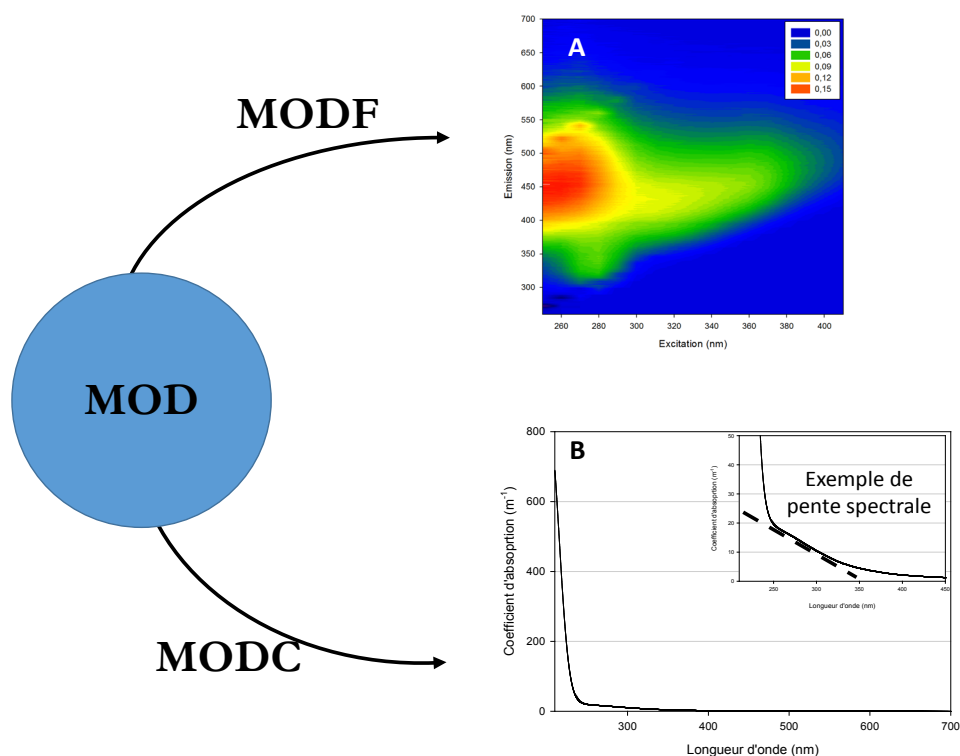


Figure I-14: Exemple de spectre de MOD fluorescente et colorée (MODC et MODF) (A) Spectre de fluorescence (B) Spectre d'absorbance UV/Vis

### *i MOD et absorbance*

La MOD aquatique absorbe fortement dans les longueurs d'onde UV/Vis ainsi la technique de spectroscopie d'absorbance UV/Vis est considérée comme un technique utile de caractérisation de la

MOD (Helms et al., 2008; Weishaar et al., 2003). L'abondance de MODC dans les estuaires et les eaux côtières a montré des effets significatifs sur les processus optiques et biologiques (écran solaire naturel, la protection du biote de surface des radiations solaires (Neale and Kieber, 2000; Vernet et al., 2000), atténuation de l'efficacité lumineuse et réduction de la production primaire (Blough and Del Vecchio, 2002). Le MODC est également à la base de certaines réactions photochimiques impliquées dans les cycles biogéochimiques (Mopper and Kieber, 2002) et est également souvent étudié pour mieux comprendre les cycles de la MOD (Griffin et al., 2011; Robert G. M. Spencer et al., 2009). Les composés et molécules constituant le MODC sont clairement mal définis cependant le MODC représente entre 20 et 70% du pool de COD (Laane and Koole, 1982) et sont dominés par du carbone aromatique (Chin et al., 1994; Stubbins et al., 2008).

Dans les écosystèmes estuariens, l'abondance de MODC est typiquement contrôlé par :

- les apports des rivières/fleuves en substances humiques dérivées de la MO des sols des bassins versants (Keith et al., 2002; Wang et al., 2004)
- les apports de MODC des sédiments des eaux interstitielles (Burdige et al., 2004; Coble, 1996)
- la dégradation et la production d'algues et de plantes supérieures (Del Castillo and Coble, 2000)
- les apports des stations et réseaux d'épuration des bassins versants (agriculture et industrie) (Bricaud et al., 1981).

La signature optique de la MODC est un spectre d'absorption dans l'UV/Vis, c'est-à-dire entre les longueurs d'onde de 200 et 800nm, qui augmente exponentiellement vers les courtes longueurs d'onde (Figure I-14). L'absorption à une longueur d'onde spécifique est ensuite utilisée pour quantifier la MODC, et la pente du spectre Figure I-14 (B) d'absorption permet d'avoir une idée de la source, de l'aromaticité, de la taille moléculaire et des propriétés chimiques de la MOD (Hayase and Shinozuka, 1995; Helms et al., 2008; Stubbins et al., 2012). Les pentes spectrales les plus faibles sont par exemple trouvées dans les eaux avec de l'activité microbienne que ce soit dans les eaux terrestres ou dans les océans profonds. A l'inverse, les pentes spectrales les plus fortes sont associées aux zones de production primaire intense (Del Vecchio and Blough, 2004; Kitidis et al., 2006) ou en présence de MODC fortement photodégradée (Helms et al., 2008; Vahatalo and Wetzel, 2004).

Les sols et la végétation vont donc amener de la MOD hautement colorée et aromatiquement riche dans les rivières. Des pentes spectrales faibles de MODC indiquent pour la plupart des eaux terrestres qu'elles sont dominées par des complexes humiques issus de la dégradation microbienne de la végétation. Les apports des rivières dans les estuaires de MO riche en matériel humique ne modifient que très légèrement la signature optique. Les mélanges d'eaux dans le milieu côtier conduisent souvent à des corrélations étroites entre salinité et la MODC ce qui permet de suivre l'exportation de

MOD terrigène dans les océans (Hernes and Benner, 2003) mais aussi d'estimer les concentrations de COD (Blough and Del Vecchio, 2002) et le mélange entre les eaux salines et douces (Coble et al., 2004).

Afin d'obtenir des informations sur les propriétés de la MODC à partir des spectres d'absorbance, des paramètres et indices (Tableau I-5) ont été développés et appliqués à l'étude de la MOD en milieu aquatique naturel tels que :

- les rapports d'absorptions – rapport de deux absorbances à des longueurs d'onde spécifiques - (Chen et al., 2002; Minero et al., 2007; Thomsen et al., 2002; You et al., 1999)
- l'aromaticité (Chin et al., 1994; Lepane et al., 2004; Schwede-Thomas et al., 2005; Thomsen et al., 2002)
- l'absorption spécifique dans les ultra-violets (SUVA) (Akkanen et al., 2005; Helms et al., 2013b, 2008; Robert G. M. Spencer et al., 2009; Spencer et al., 2007b; Weishaar et al., 2003)
- les pentes spectrales d'absorption (Pente spectrale ; (Andrew et al., 2013; Asmala et al., 2013; Fichot and Benner, 2012, 2011; Franke et al., 2012; Frey et al., 2016; Stolpe et al., 2013)
- les rapports de pentes spectrales (H. Chen et al., 2010; Fichot and Benner, 2012; Guéguen and Cuss, 2011; Helms et al., 2008).

L'absorbance à 254nm normalisée par la concentration en COD, appelée SUVA<sub>254</sub> (Specific UV Absorbance), est corrélée avec le pourcentage d'aromaticité de la MOD ( $r^2=0.97$  ; Weishaar et al., 2003). Le SUVA<sub>254</sub> est donc considéré comme un indicateur de l'aromaticité, la réactivité et du caractère hydrophobe ou hydrophile de la MOD en milieu aquatique. Quand la valeur du SUVA<sub>254</sub> est haute (supérieure à 4) la MOD est dite hydrophobe avec un caractère aromatique fort alors que quand la valeur du SUVA<sub>254</sub> est faible (inférieure à 3) la MOD est dite hydrophile (Matilainen et al., 2011). La pente spectrale ( $S$ , nm<sup>-1</sup>) de la MOD est basée sur une régression des données du spectre d'absorption avec l'Équation 1 :

*Équation 1: Equation de régression du spectre d'absorption pour le calcul de la pente spectrale (S) (Helms et al., 2008; Twardowski et al., 2004)*

$$a_{\lambda} = a_{\lambda_{ref}} \cdot e^{-S(\lambda - \lambda_{ref})}$$

Avec :  $a$  = coefficient d'absorption (nm<sup>-1</sup>)

$\lambda$  = longueur d'onde (nm)

$\lambda_{ref}$  = longueur d'onde de référence (nm)

La pente spectrale est considérée comme un puissant indicateur pour la caractérisation de la MOD, bien que les valeurs obtenues et donc les informations tirées sont très dépendantes de la zone spectrale prise pour le calcul (Carder et al., 1989; Stedmon et al., 2000). La pente spectrale,  $S$ , est considérée, entre autres, comme un indicateur de l'origine de la MOD (Tableau I-5). Elle est donc obtenue en ajustant une équation linéaire à la transformation logarithmique de l'Équation 1 ou bien en adaptant une fonction exponentielle à cette équation. La pente spectrale fournit des informations

de caractérisation de la MOD (Helms et al., 2008). La pente spectrale calculée entre les longueurs d'onde 275 et 295nm ( $S_{275-295}$ ) a été utilisée pour caractériser la MOD en termes de taille moléculaire, d'aromaticité et comme un traceur du COD terrigène dans les zones côtières et océaniques sous influence terrestre (Blough and Del Vecchio, 2002; Fichot and Benner, 2012; Helms et al., 2008) étant donné que de fortes corrélations positives ont été démontrées entre l'absorption de la MODC et le COD. Ainsi  $S_{275-295}$  présente des valeurs élevées ( $S > 0,018\text{nm}^{-1}$ ) dans les écosystèmes océaniques où la MOD est d'origine autochtone et/ou photodégradée, alors que des valeurs plus faibles ( $S < 0,018\text{ nm}^{-1}$ ) ont été obtenues pour les zones côtières influencées par des apports en MOD d'origine terrestre (Blough and Del Vecchio, 2002).

Le rapport des pentes spectrales (SR) est calculé comme le rapport de la pente spectrale pour les courtes longueurs d'onde ( $S_{275-295}$ ) sur la pente spectrale de plus grandes longueurs d'onde ( $S_{350-400}$ ) (Tableau I-5). Le rapport SR est négativement corrélé avec la taille de la MOD (Helms et al., 2008) et donne des informations sur son origine. Ainsi SR est supérieur à 1 pour les eaux sous influence marine (autour de 1,7 pour les zones côtières et de 4 pour les zones océaniques) et inférieur à 1 pour la MOD d'origine terrestre (Helms et al., 2008).

L'étude de la MOD par la mesure d'absorption pour caractériser la MOD et estimer les flux de COD dans les environnements aquatiques s'est montrée être une technique puissante et facile à mettre en œuvre. Les mesures d'absorption permettent d'augmenter les résolutions spatiales et temporelles de la dynamique de la MOD et ainsi de mieux comprendre le rôle de la MOD dans les écosystèmes. Les propriétés d'absorption de la MOD sont bien évidemment influencées par de nombreux facteurs tels que :

- la composition et la nature chimique de la MOD (Figure I-15 A) (Hu et al., 2002; Inamdar et al., 2012; Minero et al., 2007; Singh et al., 2010; Zanardi-Lamardo et al., 2004)
- la photodégradation (Figure I-15 B)(Helms et al., 2013b)
- les processus microbiens (Boehme and Coble, 2000; Helms et al., 2013b; Hernes and Benner, 2003; Moran et al., 2000; Zhang et al., 2009a)
- la présence et la concentration des matières en suspension dans le milieu (Babin et al., 2003; Blough et al., 1993; Zhang et al., 2009a)
- la salinité (Figure I-15 C)(Blough and Del Vecchio, 2002; Fichot and Benner, 2012; Hernes and Benner, 2003).

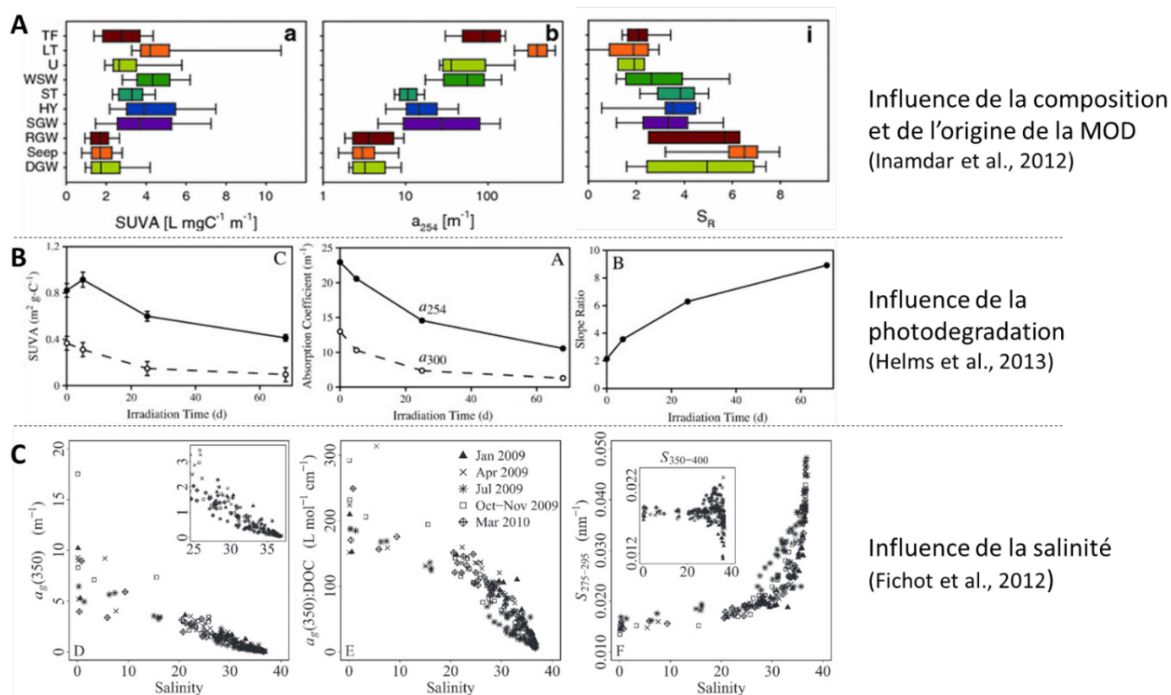


Figure I-15: Exemples des effets de la (A) composition et de l'origine de la MOD, (B) de la photodégradation et (C) de la salinité sur les indices et paramètres obtenus pour la MODC

Tableau I-5: Exemples d'indices calculés pour la MODC à partir des spectres d'absorbance

<b>Absorbance</b>				
	Nom de code	Calcul	Définition	Référence
<b>SUVA - absorbance spécifique dans l'ultraviolet (L mg C<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>)</b>	<b>SUVA<sub>254</sub></b>	Absorption à 254nm divisée par la concentration en COD	Absorbance par unité de Carbone en mg C.L-1. Une grande valeur indique un matériel plus aromatique; fournit une mesure d'aromaticité	Weishar et. 2003
<b>Coefficient d'absorption a<sub>254</sub> (m<sup>-1</sup>)</b>	<b>a<sub>254</sub></b>	(Absorbance à 254nm) x 2,303 x 0,01	Mesure de l'aromaticité de la MOD	Green and Blough (2008)
<b>Coefficient d'absorption a<sub>350</sub> (m<sup>-1</sup>)</b>	<b>a<sub>350</sub></b>	(Absorbance à 350nm) x 2,303 x 0,01	Indication sur la concentration en phénol et donc sur l'impact des apports terrigènes	Hernes and Benner 2003
<b>Pente spectrale entre 275-295 nm (nm<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>275-295</sub></b>	Ajustement non linéaire de la fonction exponentielle du spectre d'absorption sur la gamme de longueur d'onde 275-295nm	Une grande valeur peut indiquer une petite taille moléculaire ou un faible taux d'aromaticité. Aussi utilisé pour un traceur de source terrigène de carbone organique dissoute dans les zones côtières ou océanique sous influence de rivières	Blough and Del Vecchio (2002), Helms et al. (2008), Fichot et al. (2012)
<b>Rapport de pentes spectrales S<sub>275-295</sub>/S<sub>350-400</sub></b>	<b>SR</b>	Pente spectrale S275-295nm divisé par la pente spectrale S350-400nm	Il peut être utilisé comme un proxy de la taille moléculaire; plus il augmente plus la taille moléculaire diminue	Helms et al. (2008)
<b>Rapport des absorbances à 254nm et à 365nm</b>	<b>a<sub>254</sub>/a<sub>365</sub></b>	Rapport des absorbances à 254nm et à 365nm	Permet d'approximer la taille moléculaire; négativement corrélé avec la taille moléculaire	

## ii MOD et fluorescence

Une partie de la MOD chromophorique présente des propriétés de fluorescence. Les matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence de la MOD (Figure I-14) mettent en évidence les différents fluorophores constituant la MOD et donnent des informations sur sa source, sa composition chimique, son état de dégradation et sa réactivité (Coble et al., 1990; Fellman et al., 2010; McKnight et al., 2001; Parlanti et al., 2000). Le fluorophore est l'unité moléculaire qui fluoresce. La spectroscopie de fluorescence est une méthode extrêmement sensible qui permet d'analyser des fractions de MOD fluorescente dans les eaux même si leurs concentrations sont inférieures à 1mg/L et ne requière pas de volumes d'échantillon importants. Néanmoins la fluorescence est une technique dépendante de différents facteurs tels que le pH, la polarité du solvant, la température et le potentiel redox. Les propriétés de fluorescence ont été utilisées pour la première fois en 1949 pour étudier les substances humiques terrestres dans des eaux de mer (Kalle, 1949). Les substances humiques ont longtemps été considérées comme le plus grand contributeur de la fluorescence de la MOD (Ewald et al., 1983; Laane and Kramer, 1990).

Un spectre EEM est obtenu en collectant les spectres d'émission sous l'effet d'une série de longueurs d'onde d'excitation. Le résultat est un spectre en 3 dimensions où l'intensité de fluorescence (unité arbitraire souvent convertie en unité Raman) est représentée comme une fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Pour chaque échantillon, la fluorescence présente des spécificités propres se caractérisant par un ou des couples de longueurs d'onde d'excitation et émission (Ex/Em) où l'intensité de fluorescence est maximale.

Ainsi les spectres EEMs sont utilisés afin d'obtenir des informations sur le nombre, le type et la concentration des fluorophores présents dans la MOD aquatique. De ce fait, différentes longueurs d'onde spécifiques ou bandes de fluorescence associées ont été attribuées à des types de composés constituant la MOD (Tableau I-6).



Tableau I-6: Principales bandes de fluorescence de la MOD citées dans la littérature pour décrire des eaux naturelles (Coble, 2007, 1996; Parlanti et al., 2000; Stedmon et al., 2003)

Nom des fluorophores selon Coble, 1996	Nom des fluorophores selon Parlanti et al., 2000	Type de fluorophores	Origine	Longueurs d'ondes d'excitation (nm)	Longueurs d'ondes d'émission (nm)
A	$\alpha'$	Substances type humiques + matériel plus récent	allochtone	230-260	380-480
C	$\alpha$	Substances type humiques	allochtone	330-370	420-480
M	$\beta$	Matériel biologique et origine microbienne + matériel récent	allochtone/ autochtone	310-320	360-410
T	$\gamma$	Protéines et activités bactériennes	autochtone	270-280	300-350
B	$\delta$	Protéines et composés phénoliques	autochtone	280-300	320-380

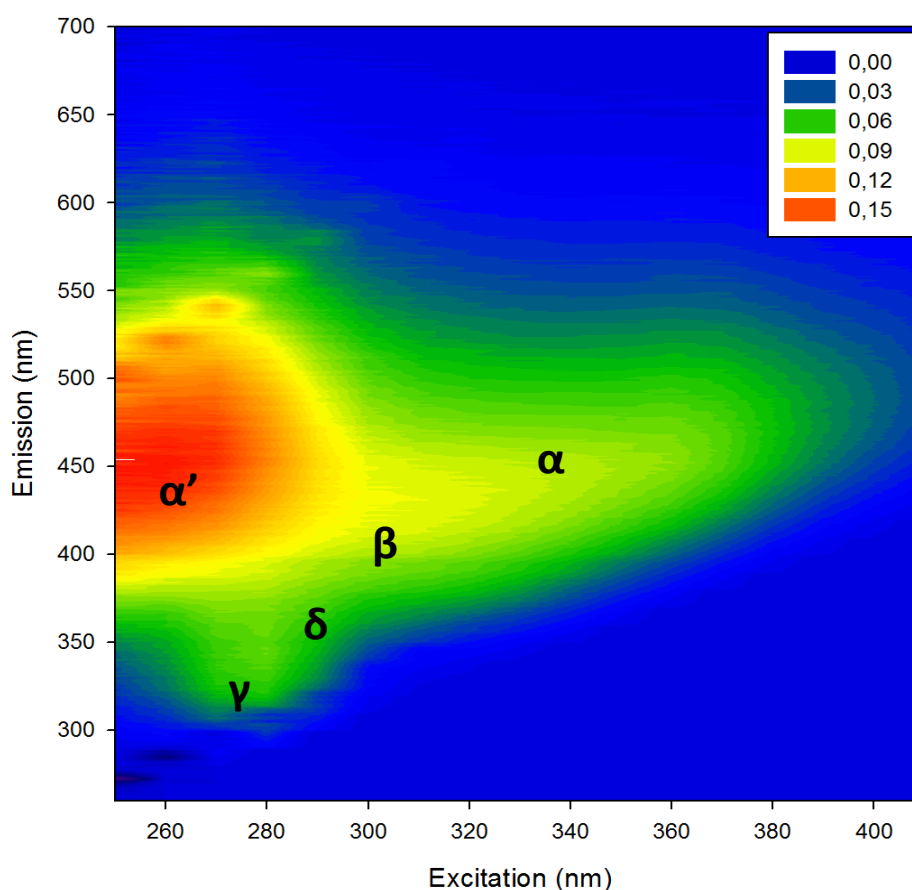


Figure I-16: Projection dans le plan d'une matrice EEM d'un échantillon de MOD collecté dans le golfe de Gascogne (Biarritz). Les lettres représentent les bandes de fluorescences spécifiques identifiées dans l'échantillon.

#### (a) Les bandes de fluorescence $\alpha'$ et $\alpha$

La bande  $\alpha'$  (Figure I-16) est associée aux substances type humiques (acides humiques et fulviques) mais également à de la matière organique plus récente et est observée à des longueurs d'onde comprises entre 230-260nm à l'excitation et 380-480nm à l'émission. La bande  $\alpha$  ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330-370\text{nm} / 420-480\text{nm}$ ) est associée également à un matériel de type humique.

Malgré que ces deux bandes aient été parfois associées respectivement pour  $\alpha$  et  $\alpha'$  au type humique et au type fulvique, il n'est pas possible de les discriminer et les décrire ainsi (Sierra et al., 2005). Il faut bien noter que la proportion des fluorophores  $\alpha$  et  $\alpha'$  varie indépendamment en fonction de la nature et de l'origine des échantillons considérés.

Le rapport des intensités de fluorescence de  $\alpha'$  sur  $\alpha$  a été utilisé pour distinguer la matière organique terrigène de la matière organique d'origine marine. Le principe se base sur le fait que l'intensité de fluorescence du fluorophore  $\alpha$  est nettement réduite en milieu marin, ainsi le rapport  $\alpha'/\alpha$  est élevé en zone océanique (Coble, 1996; De Souza Sierra et al., 1997, 1994).

Plusieurs molécules peuvent être responsables de la fluorescence des substances humiques notamment les acides hydroxybenzoïques et des dérivés de la lignine (composés phénoliques) provenant principalement de la dégradation/décomposition des plantes supérieures et aquatiques (Senesi, 1990).

#### (b) La bande de fluorescence $\beta$

La bande  $\beta$  ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 310-320\text{nm} / 360-410\text{nm}$  ; Figure I-16) initialement attribuée à du matériel de type humique marin (De Souza Sierra et al., 1994; Coble, 1996) a été observée dans des échantillons d'eaux marines et côtières (Coble, 1996; De Souza Sierra et al., 1994; C. Guéguen et al., 2011; Huguet et al., 2009; Parlanti et al., 2000, 1997), mais également dans les eaux douces (Hudson et al., 2007; Huguet et al., 2010; Murphy et al., 2008). Ce fluorophore n'apparaît pas souvent comme une bande bien résolue mais plutôt sous la forme d'un épaulement au sein du massif de la bande  $\alpha$ .

L'origine de ce fluorophore est complexe, cependant des travaux portant sur la dégradation de macro-algues ont montré que cette bande est associée à des substances fraîchement libérées au cours de leur dégradation (Parlanti et al., 2000), ainsi les activités microbiennes et bactériennes pourraient être à l'origine de ce fluorophore.

### (c) La bande de fluorescence $\gamma$

La bande de fluorescence  $\gamma$  ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 270-280\text{nm} / 290-350\text{nm}$  ; Figure I-16) est associée à des composés de type protéiques contenant des structures proches des acides aminés aromatiques tels que la tyrosine ou le tryptophane. Les longueurs d'onde d'émission plus spécifiques de ces acides aminés se trouvent vers 300-320nm pour la tyrosine et vers 320-350nm pour le tryptophane. Mais il reste cependant difficile de discerner ces deux bandes en raison des chevauchements et des potentielles interférences avec les substances humiques. Cette bande de fluorescence est due à la dégradation algale ou bactérienne récente (Cammack et al., 2004; Determann et al., 1998; Youhei Yamashita and Tanoue, 2004) et constitue une fraction particulièrement réactive de la MOD. Son intensité de fluorescence dépend de l'activité biologique et de l'état de dégradation de la MOD ; elle est la plus intense quand le matériel est fraîchement produit mais pas encore dégradé (Parlanti et al., 2000; Romera-Castillo et al., 2011). Ce fluorophore a été également utilisé comme un marqueur des activités anthropiques (Baker et al., 2004, 2003; Baker and Inverarity, 2004; F. Meng et al., 2013). Il a aussi été observé dans tous les systèmes aquatiques (eaux douces et marines) et dans les sédiments (Baker et al., 2007, 2004, 2003; Burdige et al., 2004; Hudson et al., 2007).

### iii Application de la fluorescence à l'étude de la MOD dans les eaux naturelles

La spectroscopie de fluorescence est un outil d'analyse puissant qui permet d'étudier la dynamique, les phénomènes d'interaction, de dégradation/transformation de la MOD dans les eaux en utilisant les positions des maxima de fluorescence détaillés dans les paragraphes précédents.

Les spectres de fluorescence, notamment tridimensionnelle (EEM), mettent en avant des différences significatives en fonction du type, de l'origine et de l'état des échantillons (eaux marines, eaux estuariennes, eaux de rivières, eaux de lacs, etc). La fluorescence a été principalement utilisée pour l'étude de la dynamique et des mélanges de masses en milieu côtier et estuarien (De Souza Sierra and Donard, 1991; Guéguen et al., 2007, 2006; Huguet et al., 2009; Jaffé et al., 2004; Laane and Kramer, 1990) ou la caractérisation /comparaison des masses d'eau (Carstea et al., 2010; Coble, 1996; Mopper and Schultz, 1993; Zhang et al., 2009b, 2011).

Il apparaît difficile de généraliser une corrélation entre la fluorescence de la MOD et le COD, malgré certains cas spécifiques (Chen, 1999; Klinkhammer et al., 2000; Vodacek et al., 1997, 1995), étant donné que la MOD qui fluoresce ne représente pas la totalité du COD et que les sources de MOD fluorescente varient selon les échantillons (Blough and Del Vecchio, 2002).

Les effets de la photodégradation de la MOD ont notamment été étudiés par spectrofluorimétrie dans les eaux de rivière (Gao and Zepp, 1998; Mostofa et al., 2007; Patel-Sorrentino et al., 2004; Robert G M Spencer et al., 2009), eaux estuariennes (Gonsior et al., 2009; Moran et al., 2000; Skoog et al., 1996; Tzortziou et al., 2007) ou bien les eaux marines (Boehme et al., 2004; Del Vecchio and Blough, 2004; Helms et al., 2013b; Nieto-Cid et al., 2006). Les modifications des positions des maxima et d'intensité de fluorescence ont renseigné sur les effets de la photodégradation qui se traduit principalement par une diminution de l'absorbance UV, des intensités de fluorescence, du caractère aromatique ainsi que de la taille de la MOD. La photodégradation modifie donc la biodisponibilité de la MOD.

De plus, l'analyse de la MOD par spectrofluorimétrie permet d'estimer l'activité biologique au sein des écosystèmes aquatiques (Parlanti et al., 2000). Ainsi au cours d'une expérience de dégradation d'algues, le fluorophore  $\gamma$  (type protéique) apparaît dans un premier temps, suivie par le fluorophore  $\beta$  puis dans le laps de temps plus long le fluorophore  $\alpha$  (type humique) est apparue pour ensuite devenir majoritaire (Parlanti et al., 2000). Les bandes de fluorescence  $\gamma$  et  $\beta$  permettent de caractériser une activité biologique de dégradation en milieu aquatique. La bande de fluorescence  $\gamma$  qui caractérise principalement les activités biologiques, continue d'être largement étudié afin de mieux comprendre la dynamique de ces molécules dans le milieu naturel (Determann et al., 1998; Jason B. Fellman et al., 2009; Gonsior et al., 2009; Jaffé et al., 2004; Maie et al., 2007; Romera-Castillo et al., 2013; Yamashita and Tanoue, 2003). Un indice d'activité biologique ou de contribution autochtone (BIX) a été développé afin de caractériser cette activité et ainsi mieux comprendre la dynamique de la MOD sur ce point-là (Huguet et al., 2009; Vacher, 2004). Il correspond au rapport des intensités de fluorescence à 380nm (maximum d'émission de la bande  $\beta$  quand présente) et celle à 430 (maximum d'émission de la bande  $\alpha$ ) pour une longueur d'excitation à 310nm et permet d'estimer entre autres la production de MOD due à l'activité biologique autochtone et ainsi la présence de matière organique fraîchement produite dans le milieu (une valeur supérieure à 1 indique une MOD produit récemment et d'origine autochtone et plus cette valeur se rapproche de 0,5 plus la part de la matériel frais est faible).

L'indice d'Humification HIX (Zsolnay et al., 1999) a été développé pour estimer rapidement l'origine et le degré de maturation de la MOD en se basant sur le fait que le maximum de fluorescence de la bande  $\alpha'$  se décale vers de plus grandes longueurs d'onde lorsque l'aromaticité et donc le degré de maturation augmente.

Enfin, l'utilisation de la fluorescence dans les environnements aquatiques naturels permet également d'étudier les interactions entre la MO et les contaminants. En effet les intensités de fluorescence et positions des maxima peuvent être modifiées lorsque la MOD est complexée avec des contaminants (organiques ou inorganiques) (Backhus et al., 2003; W. B. Chen et al., 2013; Fang et al., 1998; Kong et al., 2013; Lu and Jaffe, 2001; Pan et al., 2012). Souvent le phénomène amenant à une diminution de

fluorescence lorsque la MOD est complexée est appelé l'extinction de fluorescence ou le quenching. Cette technique est notamment utile pour définir la capacité complexante de la MOD et mettre en évidence des interactions avec les contaminants.

#### iv Application de PARAFAC pour l'étude de la MOD par spectroscopie de fluorescence

Dans un spectre de fluorescence EEM de MOD, les pics se superposent et ont des influences les uns sur les autres. Cette superposition est en réalité une combinaison linéaire de pics de fluorescence propres à chaque fluorophore. Afin d'extraire plus d'informations des spectres de fluorescence EEM, Bro en 1997 développe une méthode numérique de traitement des spectres permettant une séparation mathématique des différentes contributions spectrales (Bro, 1997). Cette méthode nommée PARAFAC (PARAllel FACtors analysis) est inspirée d'un logarithme utilisé depuis 1970 dans le domaine de la psychométrie. Depuis, cette approche statistique de modélisation est devenue incontournable pour traiter les spectres tridimensionnelles (Bro, 1999; Bro and Kiers, 2003; Stedmon et al., 2003). En 2003 PARAFAC est utilisé pour la première fois pour étudier la MOD de milieux naturels afin de suivre sa production et dégradation dans l'environnement (Stedmon et al., 2003; Stedmon and Markager, 2003). Dès lors l'application de PARAFAC est devenue courante dans les études de la MOD par fluorescence dans les rivières (H. Chen et al., 2013; M. Chen et al., 2010; Jason B Fellman et al., 2009; Nie et al., 2016; Shi et al., 2016; Stedmon et al., 2011), les lacs (Borisover et al., 2009; Cory and McKnight, 2005; Hua et al., 2010; Kothawala et al., 2012; Zhang et al., 2011), les zones humides (H. Chen et al., 2013; Chow et al., 2013; Fellman et al., 2008; Maie et al., 2014; Yamashita et al., 2010), les estuaires (Guéguen et al., 2016; W. Guo et al., 2011; Osburn et al., 2016; Wang et al., 2014; Yamashita et al., 2008), les eaux marines et côtières (Andrew et al., 2013; Catalá et al., 2015; C. Guéguen et al., 2011; Kowalczyk et al., 2010; Murphy et al., 2008; Stedmon et al., 2007) et les eaux de réseaux et stations d'épuration (Guo et al., 2010, 2012; Jiang et al., 2008; Sanchez et al., 2013; Yu et al., 2013).

## *b Les techniques de séparation et fractionnement de la MOD*

Dans l'étude de la MOD, que ce soit au niveau de la composition élémentaire, des groupements fonctionnels ou encore de la structure, un fractionnement est souvent nécessaire compte tenu de l'extrême hétérogénéité de la MOD. De plus, les propriétés de la MOD dans les environnements aquatiques sont inégalement réparties dans les différentes classes de tailles possibles.

Les études réalisées sur la distribution de la taille moléculaire de la MOD ont permis de mieux comprendre les caractéristiques physiques, chimiques ainsi que la dynamique de la MOD des écosystèmes aquatiques. De nombreux outils analytiques sont utilisés pour fractionner la MOD selon différents critères tels que la solubilité (extraction par des solvants ou lyophilisation), la taille (ultrafiltration, ultracentrifugation, chromatographie par exclusion stérique ou bien le fractionnement par couplage flux-force), l'hydrophobicité, etc.

Les trois techniques les plus utilisées dans l'étude de la MOD aquatique sont l'ultrafiltration (Benner et al., 2003; Benner and Opsahl, 2001; Huguet et al., 2010; Liu et al., 2007; Simjouw et al., 2005; Tadanier et al., 2000), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC ; Chow et al., 2008; Her et al., 2003; Huber et al., 2011; Müller et al., 2000; Schäfer et al., 2002; Woods et al., 2009) et le fractionnement par couplage flux-force (AF4; Alasonati et al., 2010; Assemi et al., 2004; Beckett et al., 1987; Cuss and Guéguen, 2012; Gueguen et al., 2011; Guéguen et al., 2013; Moon et al., 2006; Stolpe et al., 2010).

### *i Fractionnement par ultrafiltration*

L'ultrafiltration tangentielle est une technique efficace et largement utilisée pour séparer les composés de la MOD en fonction de leur gamme de tailles sans application de solvant ou de tampon. Cette technique ne nécessite pas de changer les paramètres physico-chimiques des échantillons (pH, température...). L'échantillon de MOD est séparé en deux parties selon le seuil de coupure de la membrane utilisée, le perméat et le rétentat, sous l'effet de la pression. Les composés qui ont une masse moléculaire supérieure au seuil de coupure de la membrane sont donc retenus au-dessus et concentrés dans la partie du rétentat alors que les composés de masse moléculaire inférieure au seuil de coupure de la membrane passent librement à travers dans la fraction du perméat et sont donc à la même concentration dans le perméat et le rétentat. Cette technique a été utilisée dans tous les environnements aquatiques et a permis de mieux comprendre la MOD (Gueguen et al., 2002; Huguet et al., 2010; Yoshioka et al., 2007). Ces techniques séparent donc les composés en fractions de différentes tailles mais il apparaît clair que ce n'est pas le seul critère de fractionnement. Les interactions entre la membrane d'ultrafiltration et les molécules peuvent avoir une grande

importance. De plus la séparation par ultrafiltration permet d'obtenir des gammes de masses moléculaires ou de tailles approximatives.

Un des principaux avantages de cette méthode de séparation de la MOD repose sur le fait qu'elle est basée sur des critères physiques et qu'elle ne nécessite pas d'impliquer des solutions chimiques qui pourraient interagir avec les molécules et ainsi potentiellement changer la structure ou la composition de la MOD. De plus elle permet de concentrer les molécules dans le rétentat. Différents paramètres peuvent influencer la séparation et donc la gamme de tailles obtenues (Leenheer and Croue, 2003) parmi les plus influents le type de membrane utilisée, le pH et la force ionique de l'échantillon.

## ii Fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique de chromatographie où la séparation des molécules est basée sur l'hypothèse que le phénomène d'exclusion est le seul entièrement responsable de la séparation des molécules chimiques (les composés de plus grandes tailles étant élués en premier). La séparation est basée sur la différence de perméabilité et de taille d'un mélange de molécules dans une matrice poreuse. Ainsi les molécules les plus grosses vont moins interagir avec la matrice que les petites et donc être moins retenues dans la colonne. Elles sont donc éluées en premier et les plus petites vont être éluées en dernier.

Les techniques de SEC de nouvelle génération, chromatographie d'exclusion stérique haute pression (HPSEC), ont été communément utilisées pour l'étude de la distribution de la taille moléculaire de la MOD dans les écosystèmes aquatiques et terrestres (Alasonati et al., 2010; Bhatia et al., 2013; Everett et al., 1999; Pelekani et al., 1999; Pérez et al., 2011; Qin et al., 2012), eaux industrielles (Knuutinen et al., 1988), marais ou zone humide (Alberts et al., 2002; Woods et al., 2009), lacs (Espinoza et al., 2009; Kawasaki et al., 2011; Lepane et al., 2004), estuaire (Everett et al., 1999; Minor et al., 2002), eaux marines (Dittmar and Paeng, 2009; Koch et al., 2008; Sánchez-González et al., 2012). Dans une proportion relative, cette méthode a l'avantage d'être non-destructive, relativement rapide et qui demande un faible volume d'échantillon et n'a pas besoin de prétraitement (Matilainen, 2007).

Différents paramètres influencent la séparation en SEC ou HPSEC et nécessitent d'être développés en fonction de l'objectif d'étude. Ainsi les colonnes et phases mobiles (pH, force ionique et nature des ions de la phase mobile) sont optimisées (Her et al., 2002; Hongve et al., 1996; Peuravuori and Pihlaja, 1997; Swietlik and Sikorska, 2006).

### iii Fractionnement par couplage flux/force

Le fractionnement par couplage flux-force (FFF) a été développé pour la première fois par Giddings en 1966 comme une méthode de séparation des macromolécules et colloïdes. Le FFF est une méthode de séparation en ligne basée sur un principe physique qui a lieu dans un canal de séparation sous l'effet d'un champ de force perpendiculaire au flux de déplacement des molécules. Ce champ de force peut avoir différentes natures : électrique, thermique, flux de force de phase mobile... selon les informations souhaitées (taille, densité, masse molaire...) (Schimpf et al., 2000) et les objets étudiés. Elle a l'avantage d'être une technique versatile, robuste et capable de fractionner une large gamme de molécules allant de 0,1nm à 100µm (Nilsson, 2013). Le FFF est une technique proche de la chromatographie liquide mais où la séparation se fait dans un canal et non dans une colonne. La description détaillée de cette technique est faite dans le chapitre 2 matériel et méthodes.

Cette technique peut typiquement être couplée avec des détecteurs de type spectrophotométrie UV/Vis, spectrofluorimétrie, diffusion de lumière laser (MALLS), réfractomètre. De nombreux paramètres peuvent influencer la séparation tels que la composition de la phase mobile (pH, force ionique et nature des ions), les flux (principaux, croisé, focus), la taille du canal, le seuil de coupure et le matériau de la membrane...

Les techniques FFF sont séparées en deux grandes familles en fonction du type de force fluïdique engendrant la séparation. Parmi l'ensemble des techniques de fractionnement dites de FIFFF, on retrouve donc le fractionnement par couplage flux/force avec flux asymétrique (AF4). Le fractionnement par AF4 est basé sur le coefficient de diffusion des particules. La séparation par flux asymétrique permet un fractionnement plus rapide des molécules et de réduire les phénomènes de dilution, souvent problématique lors de l'étude environnementale à faible concentration. De plus l'AF4 présente l'avantage par rapport aux autres techniques de FFF que la nature de la force utilisée pour le fractionnement peut avoir un effet sur toutes les particules (Wahlund et al., 1987).

Cette technique AF4 s'avère donc être de choix pour l'étude de la MOD dans les environnements aquatiques naturels et a été utilisée dans le cas des eaux terrestres (Alasonati et al., 2010; Beckett et al., 1987b; Guéguen and Cuss, 2011; Stolpe et al., 2010a; Wells, 2004; Yohannes et al., 2005; Zanardi-Lamardo et al., 2001), des lacs (Moon et al., 2006; Pifer et al., 2011; Pifer and Fairey, 2012; Zanardi-Lamardo et al., 2002) des eaux estuariennes (Balch and Guéguen, 2015a; Boehme and Wells, 2006; Stolpe et al., 2010a), des zones côtières ou marines (Hassellöv, 2005; Mangal and Guéguen, 2015; Stolpe et al., 2014, 2010a; Zanardi-Lamardo, 2004; Zanardi-Lamardo et al., 2002).

Les principaux avantages de la technique FFF sont la possibilité d'étudier un large continuum de tailles de MOD (0,1nm à 100µm), le fait d'être basé sur les coefficients de diffusion qui sont des paramètres



importants dans le comportement de la MOD dans l'environnement, l'absence de phase stationnaire ce qui permet de réduire les interactions potentielles, de nombreuses possibilités de couplages pour la détection.

#### iv Comparaison des techniques séparatives

Dans une grande majorité des travaux sur le fractionnement de la MO par les différentes techniques disponibles, les techniques en lignes telles que la SEC ou FFF se révèlent être les plus performantes en terme de résolution, rapidité d'analyse et fiabilité (recouvrement des échantillons ou contamination). Elles présentent également l'avantage de ne pas nécessiter de grandes quantités d'échantillons grâce à une « pré-concentration » préalable au fractionnement dans le système AF4. Ainsi le fractionnement en ligne de la MO naturelle en fonction de la taille des composés est donc généralement plus efficace.

Le problème majeur qui peut être rencontré dans l'étude de la MO naturelle lors du fractionnement ou de la caractérisation réside dans les interactions des molécules avec les systèmes analytiques. Ces interactions peuvent conduire à des phénomènes de sorption plus ou moins réversibles. Cependant dans l'étude par FFF ces interactions sont moins importantes en raison de l'absence de phase stationnaire, et des dimensions du canal de séparation, même si il peut y avoir des interactions entre la membrane et les molécules (Bolea et al., 2006; Schimpf and Petteys, 1997). De plus du fait des faibles interactions en FFF, la phase mobile utilisée peut avoir une force ionique beaucoup moins importante que celle utilisée en SEC par exemple. Ce qui représente un avantage conséquent pour les détecteurs couplés en ligne. La SEC reste une méthode efficace pour l'étude par fractionnement de macromolécules, cependant l'inconvénient de l'étude de la MOD par SEC réside dans les interactions possibles entre la phase stationnaire et les molécules pouvant ainsi entraîner une altération de la représentativité de l'analyse.

La FFF apparaît donc être une technique plus intéressante pour l'étude d'échantillons naturels comme la MOD. Un échantillon de MOD contient en effet des macromolécules, colloïdes, nanoparticules et divers agrégats et seul le FFF permet de fractionner directement et en une seule fois ce type d'échantillon avec un large éventail de tailles sans préparation préalable.

Enfin, une technique de séparation ne peut être appliquée seule, elle doit être associée à des détecteurs optimisés ou bien une procédure d'étalonnage doit être réalisée.





## Enjeux liés aux développements de méthodes d'analyse pour la MOD

Cette étude bibliographique a permis de mettre en avant un certain nombre de points importants à prendre en compte pour l'étude de la MOD en milieu aquatique naturel, qui ont orienté les objectifs de ces travaux de thèse :

- **Enjeu du choix des techniques de séparation et caractérisation de la MOD**

Au vue de la complexité et hétérogénéité de la MOD en milieu naturel il est nécessaire d'utiliser des techniques analytiques sensibles et robustes permettant d'obtenir le plus d'informations possibles et ainsi obtenir la meilleure caractérisation.

- **Enjeu du choix d'une méthode de séparation fiable, rapide et facile à mettre en œuvre**

Il apparaît primordial d'étudier la MOD selon sa taille grâce à une technique de séparation la plus respectueuse des composés mais également facile et rapide à mettre en œuvre afin qu'elle soit utilisable sur des séries d'échantillons de grandes ampleurs.

- **Enjeu de caractériser la MOD dans les environnements naturels**

Dans un contexte où plus de 60% de la population mondiale vit en zone côtière il est d'autant plus intéressant de comprendre la dynamique des écosystèmes aquatiques. Ainsi il apparaît primordial de travailler dans les estuaires afin de mieux comprendre la dynamique de la MOD et définir son impact sur le comportement, la biodisponibilité et les effets des contaminants dans ces zones.

Enfin il est nécessaire d'étudier la MOD le plus globalement possible et de pouvoir effectuer de larges suivis spatio-temporels au sein des différents sites étudiés.

A l'ensemble des contraintes et enjeux doivent s'ajouter les problématiques spécifiques aux environnements naturels étudiés. Globalement concernant la MOD dans les estuaires de Seine et de Gironde, peu de données de caractéristiques structurales et moléculaires ou de dynamique spatio-temporelle au sein de ces écosystèmes complexes sont disponibles. Ces estuaires sont les réceptacles de grands bassins soumis à des forçages spécifiques (la marée, les débits, le bouchon vaseux, les apports anthropiques agricoles et urbains...) qui influenceront la dynamique de la MOD.

Dans ce contexte, le développement d'une méthodologie de séparation par AF4 pour l'étude de la MOD en milieu aquatique naturel a été mené associé à l'utilisation de différentes techniques optiques de caractérisation en couplage.

L'enjeu analytique de cette étude a été de choisir la meilleure combinaison de techniques et méthodes (fiable, sensible, robuste, rapide...) en fonction de l'étude environnementale afin de mieux comprendre et définir la dynamique de la MOD dans ces milieux. Ainsi au cours de cette thèse, des méthodes comme l'AF4, la spectroscopie optique (UV/Vis et de fluorescence) ont été développées et appliquées aux estuaires de Seine et de Gironde. Un autre enjeu de ce travail a été le traitement statistique des données expérimentales en combinant différentes approches afin d'exploiter au mieux les résultats analytiques.

## Objectifs des travaux de thèse

L'objectif général de ces travaux de thèse était de développer des méthodes de caractérisation de la MOD aquatique naturelles à l'aide du fractionnement par couplage flux force, de la spectrométrie UV/VIS et de fluorescence.

Pour cela, un développement et une validation méthodologique de séparation par AF4 a été mené sur des étalons organiques, des standards de MOD puis des échantillons naturels. L'un des enjeux a été que les méthodes soient robustes, sensibles et respectueuses des échantillons tout en étant rapides à mettre en œuvre pour qu'elles soient applicables avec des analyses de grandes séries d'échantillons.

Pour la suite, ces méthodes AF4 couplées aux techniques de spectrométrie UV/Vis et de fluorescence ont été mises en œuvre pour l'étude de la MOD des estuaires de Gironde et de Seine afin de mieux comprendre sa dynamique au sein de continuums rivière-océan, notamment dans le cadre du projet MOSAIC (Programme Seine Aval 5). De plus, différentes approches statistiques ont été menées et développées dans le but de mieux utiliser les nombreuses variables descriptives de la MOD ainsi que les données environnementales. Dans ce but, des outils statistiques tels que les analyses en composantes principales, tests de corrélation, modèles de régression linéaire multiple et les cartes de Kohonen (Self-Organizing Maps) ont été utilisés dans les différentes études.



## Chapitre II Matériel et méthodes



Ce chapitre présente les sites d'études, les techniques et méthodes d'analyses, les procédures appliquées aux échantillons et le traitement des données.

## I Sites d'échantillonnage

### 1 Estuaire de la Gironde

Les estuaires sont des zones à l'interface entre les eaux marines et les eaux douces terrestres, ils sont caractérisés comme des milieux complexes jouant des rôles importants sur l'écologie et l'économie. Avec ses 76 km de longueur l'estuaire de la Gironde (Figure II-1), situé dans le sud-ouest de la France, est l'un des plus grands d'Europe occidentale (Figure II-1). Il commence au Bec d'Ambès qui représente le point de confluence de la Garonne, longue de 647 km au bassin versant de 56 075 km<sup>2</sup> et de la Dordogne, longue de 490 km au bassin versant de 23 902 km<sup>2</sup> (J. Schäfer et al., 2002). La Gironde est donc le réceptacle d'un bassin versant de plus de 89 397 km<sup>2</sup> et d'activités humaines (environ 5 millions d'habitants). Les distances sur l'estuaire sont comptées en points kilométriques (PK) avec comme point de référence (PK 0) le pont de Pierre à Bordeaux. L'estuaire présente une forme d'entonnoir avec une largeur d'environ 2 km au Bec d'Ambès (PK 25) puis un élargissement progressif pour atteindre environ 11 km (à marée haute) au niveau de Meschers-sur-Gironde (PK 85). Il est ainsi possible de découper l'estuaire en trois zones selon l'influence de la marée (Allen et al., 1972) :

- estuaire fluvial, de la limite d'influence de la marée dynamique (La Réole PK -70) jusqu'au Bec d'Ambès (PK 25)
- estuaire amont, du bec d'Ambès jusqu'à Saint-Christoly (PK 65)
- estuaire aval, de Saint-Christoly à l'embouchure (PK 95)

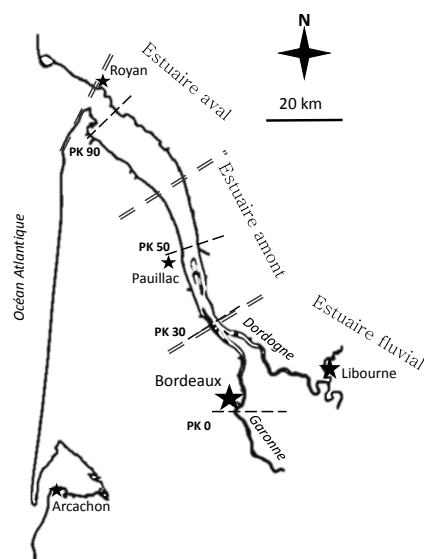


Figure II-1: Schéma de l'estuaire de la Gironde

La dynamique de l'estuaire de la Gironde est influencée par deux paramètres, la marée et le débit fluvial, qui gouvernent les courants. La Gironde est un estuaire macrotidal avec une amplitude de marnage oscillant généralement entre 1,5 et 5 m et caractérisé par une forte turbidité. La portée de la zone saline peut varier suivant le rythme des marées semi-diurnes, ou encore selon les saisons et les différences d'apports en eau douce. Les débits moyens, mesurés ces 20 dernières années, de la Garonne et de la Dordogne étaient respectivement de l'ordre de  $537 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  et de  $312 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  (Source : Eau France). Le régime de la Gironde est pluvio-nival cela signifie de fortes crues printanières et hivernales avec des débits autour  $1000 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  et des débits bien plus faibles en été autour de  $200 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  (Source : <http://www.eaufrance.fr/>).

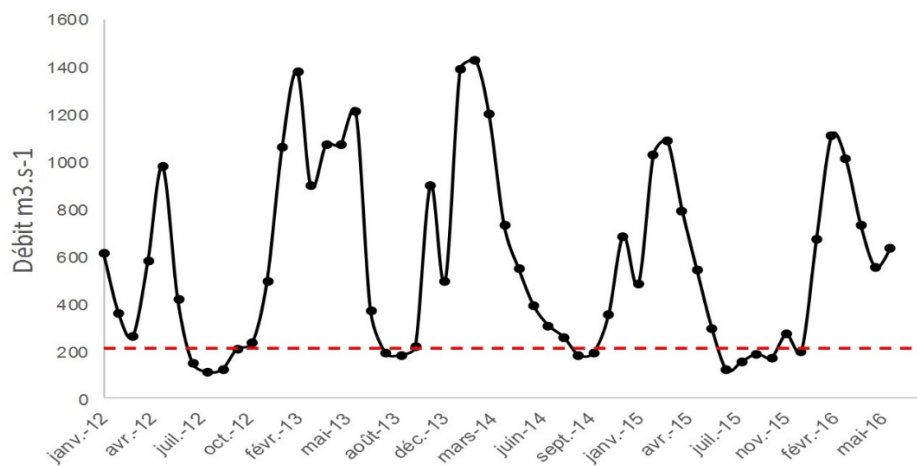


Figure II-2: Evolution des débits moyens mensuels de la Garonne à Tonneins de Janvier 2012 à Juin 2016 (tiret rouge représente la moyenne basse en été) (Source : Eau France)

Cet estuaire est caractérisé par une marée semi-diurne asymétrique (durée de jusant plus longue que celle de flot) d'une période de 12h25. La Garonne et la Dordogne sont responsables d'apports annuels de l'ordre de deux millions de tonnes de particules dont plus de 60 % sédimentent dans l'estuaire (Cancino and Neves, 1999). De plus la remobilisation des sédiments lors des mouvements d'eau dus à la marée entretient une zone de forte concentration en matières en suspension (MES) pouvant s'étendre jusqu'à plusieurs dizaines de km, elle est nommée zone de turbidité maximale ou bouchon vaseux. De ce fait, les concentrations de MES observées en surface sont régulièrement comprises entre quelques centaines de  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  et  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Etcheber et al., 2011; Lanoux, 2013). Principalement localisé entre les PK 30–50, la position du bouchon vaseux reste variable au cours d'une année et entre les années selon les débits fluviaux (Figure II-3) (Sottolichio and Castaing, 1999).

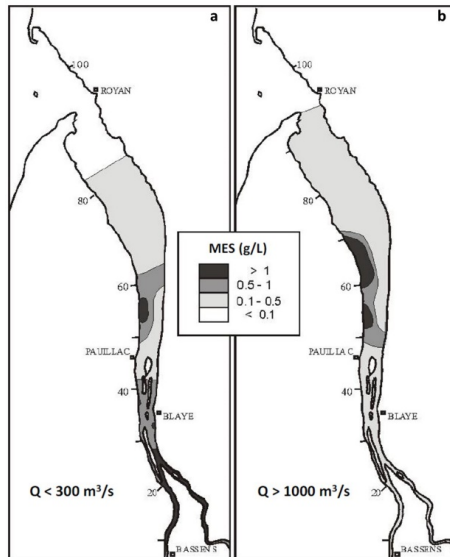


Figure II-3: Distribution des concentrations en matières en suspension en surface mesurées pour 2 débits fluviaux a) faible débit b) débit moyen à marée basse (Sottolichio and Castaing, 1999)

Dans le cadre de la campagne HALOGIR qui visait à établir une première cartographie de la contamination du sédiment de l'estuaire de la Gironde par les contaminants organohalogénés, les facteurs de contrôle potentiels de leur répartition dans la colonne d'eau, dont la MOD, ont été également étudiés. La campagne d'échantillonnage s'est déroulée début Septembre 2014 (3–7 Septembre) à bord du navire de recherche Côtes de la Manche. Au total seize stations de prélèvement ont été ciblées dans l'estuaire de Gironde (G1-G16 ; Figure II-4) et quatre en milieu marin dans le golfe de Gascogne au niveau de la vasière Ouest-Gironde (G17-G20 ; Figure II-4). Le tableau II-1 détaille ces 39 échantillons.

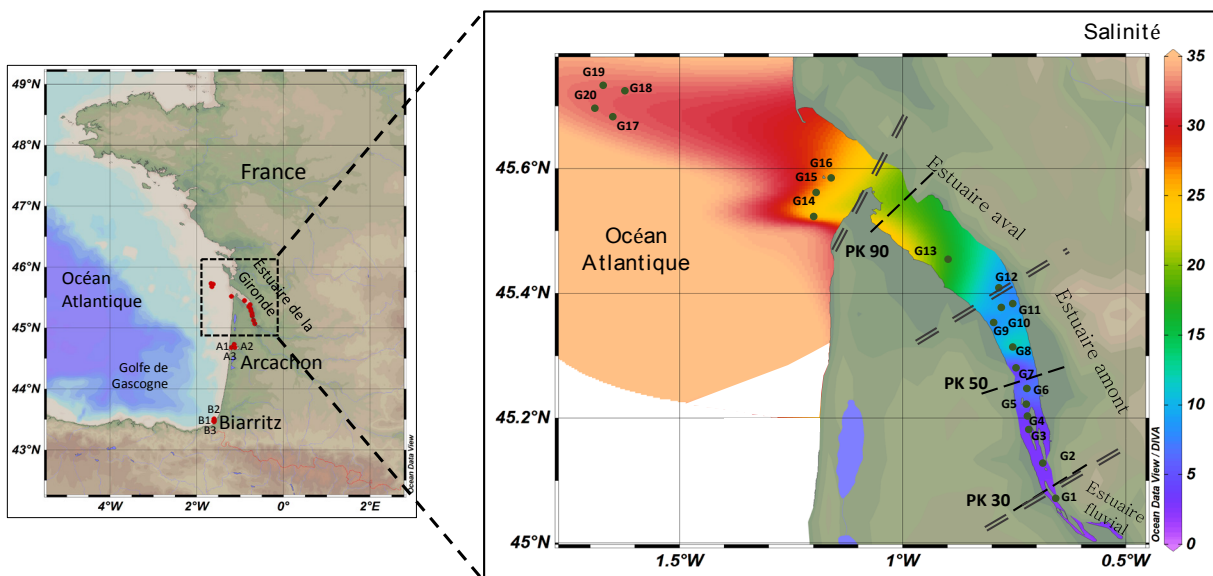


Figure II-4: Carte générale de l'estuaire de Gironde avec la position des points d'échantillonnage et leur salinité associée au moment du prélèvement (PK: point kilométrique, distance en kilomètres depuis le Pont de Pierre à Bordeaux)

Tableau II-1: Liste des échantillons étudiés dans l'estuaire de Gironde

<i>Point carte</i>	<i>Nom</i>	<i>Profondeur</i>	<i>Salinité</i>	<i>pH</i>	<i>Température</i>
G1	1 S	Surface	2,3	8,0	25,7
G2	2 S	Surface	2,9	7,8	22,4
G3	3 S	Surface	3,5	7,7	22,2
G4	4 S	Surface	3,8	7,9	24,0
G5	5 S	Surface	4,9	8,0	24,9
G6	6 S	Surface	5,8	8,0	24,3
G7	7 S	Surface	6,9	8,0	24,8
G8	8 S	Surface	7,2	7,9	24,2
G9	9 S	Surface	7,9	8,0	22,7
G10	10 S	Surface	8,2	8,0	24,1
G11	11 S	Surface	9,8	7,9	24,8
G12	12 S	Surface	12,0	8,0	24,1
G13	13 S	Surface	17,5	8,0	22,6
G14	14 S	Surface	24,1	8,0	23,3
G15	15 S	Surface	25,8	8,0	23,1
G16	16 S	Surface	26,6	8,0	23,0
G17	17 S	Surface	32,4	8,6	22,2
G18	18 S	Surface	32,5	8,2	22,2
G19	19 S	Surface	32,6	8,2	22,2
G20	20 S	Surface	32,7	8,1	21,5
G1	1 F	Fond	2,1	8,0	25,1
G2	2 F	Fond	2,6	7,8	22,2
G3	3 F	Fond	3,9	7,8	24,4
G4	4 F	Fond	4,5	7,5	22,7
G5	5 F	Fond	5,8	8,0	25,0
G6	6 F	Fond	6,0	7,9	24,8
G7	7 F	Fond	6,8	7,9	25,0
G8	8 F	Fond	7,2	7,9	24,6
G9	9 F	Fond	8,2	8,0	24,1
G10	10 F	Fond	9,6	7,9	24,6
G11	11 F	Fond	14,1	8,0	24,3
G12	12 F	Fond	22,3	8,0	22,4
G13	13 F	Fond	23,5	7,9	23,3
G14	14 F	Fond	26,1	8,0	23,0
G15	15 F	Fond	27,6	7,9	22,7
G16	16 F	Fond	27,9	8,0	22,6
G17	17 F	Fond	33,0	8,0	16,6
G18	18 F	Fond	33,1	8,1	20,4
G19	19 F	Fond	33,4	8,2	17,4

## 2 Estuaire de la Seine

La Seine, longue de 776 km entre la Côte d'Or et la Manche, draine un bassin versant de 79 000 km<sup>2</sup> représentant 12 % de la superficie nationale et avec environ 17.5 millions de personne (soit 30% de la population) vivant sur ce territoire (constitué à 85 % d'aires urbaines). Ce bassin versant presque entièrement situé dans le bassin parisien représente 23 000 km de cours d'eau par lesquels s'écoulent environ 14 milliards de m<sup>3</sup> d'eau par an. Les apports amont représentent les volumes d'eau arrivant dans l'estuaire au niveau du Barrage de Poses (Figure II-5). Le débit moyen sur les dix dernières années est d'environ 534 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> cependant l'estuaire est caractérisé comme pluvio-nival. Le débit est donc minimal en période estivale autour de 300 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (source : GIP Seine AVAL, MEDDE, Banque HYDRO ; Figure II-5) et maximal en période hivernale avec environ 800 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (Figure II-5). En plus des apports directs de la Seine il est important de prendre en compte les apports intra-estuariens pouvant représenter plus de 30 % du débit du barrage de Poses en période d'étiage (DIREN Haute Normandie 2004) et environ 12 % en période de crue (Durand and Laignel, 2012). Les apports naturels en eau douce dans l'estuaire de Seine ont trois origines : les apports amont de la Seine, les apports intra-estuariens des affluents de l'estuaire et les apports souterrains des nappes. Ainsi selon la période de l'année, les apports de ces trois sources fluctuent de façon non négligeable.

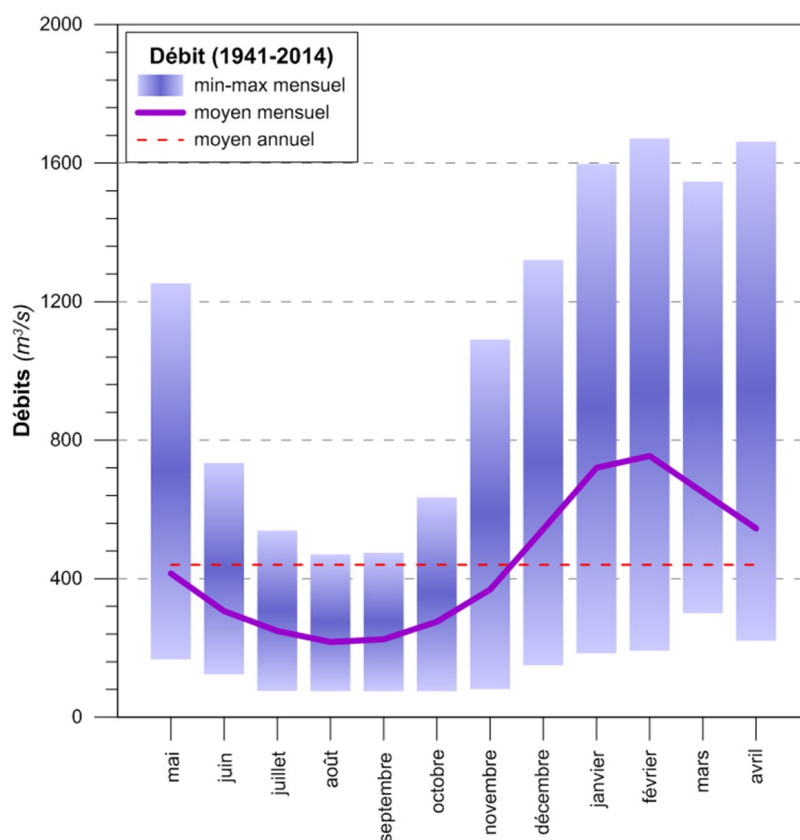


Figure II-5: Débit moyen mensuel de la Seine à Poses entre 1941 et 2014 (source : GIP Seine AVAL, MEDDE, Banque HYDRO)

Cette zone assure plus de 50% du trafic fluvial français, 40 % de l'activité économique et 30 % de l'activité agricole nationale, alors qu'en termes d'occupation des sols 66,5 % est agricole, 25,6 % est couvert par des forêts et zones humides, 7,1 % est artificialisé par l'Homme.

Ce système est donc largement influencé par les pressions anthropiques avec des impacts physico-chimiques directs (micropolluants, flux de nutriments et matière organique...) sur le fleuve, l'estuaire et la baie de Seine. L'estuaire se retrouve donc à l'interface entre le bassin versant en amont et la baie de Seine en aval avec d'un côté les apports en eau douce impactés par les activités anthropiques et de l'autre les apports d'eau marine salée.

L'estuaire de Seine (Figure II-6) est caractérisé par un régime macrotidal avec une amplitude de marée proche de 8 mètres. Il est possible de découper l'estuaire (Figure II-6) en trois secteurs (Fairbridge, 1980; Guézennec et al., 1999) :

- estuaire amont ou fluvial de Poses (PK 202) à Vieux-Port (PK 325) sous l'influence de la marée dynamique
- estuaire moyen de Vieux-Port (PK 325) à Honfleur (PK355) zone de mélange des eaux sous l'influence de la marée
- estuaire aval ou marin de Honfleur (PK 355) à la Baie de Seine

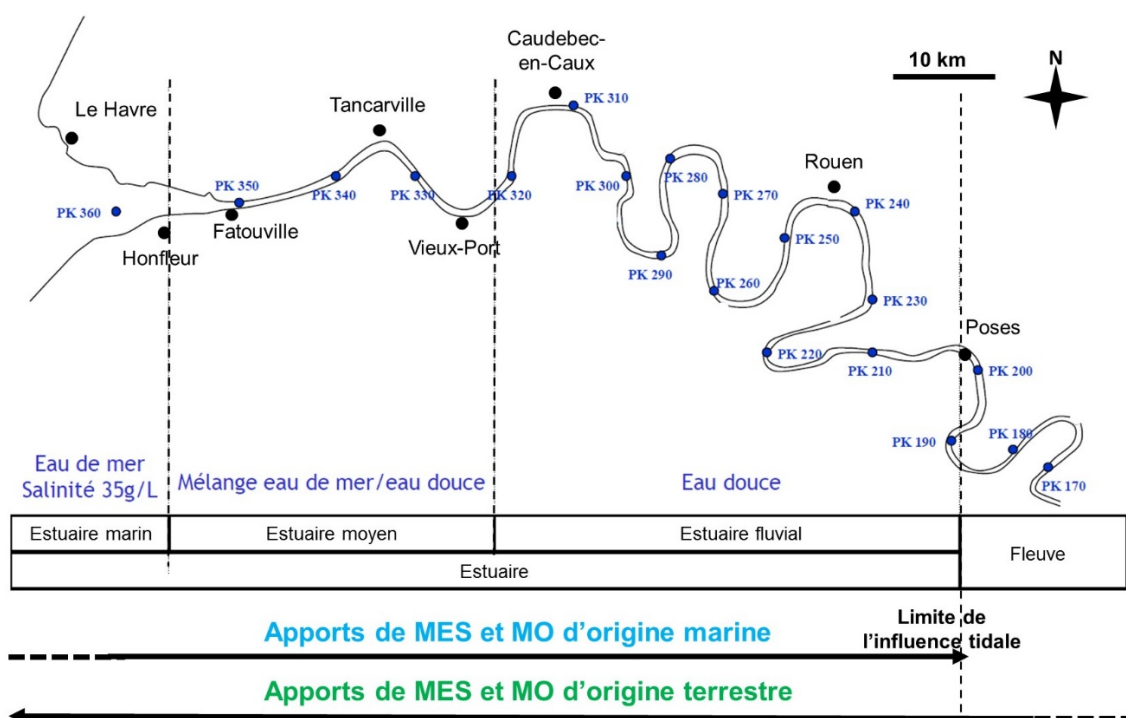


Figure II-6: Estuaire de la Seine (PK : point kilométrique) (inspiré de (Lanoux, 2013))

L'estuaire aval (ou marin) compris entre la Baie de Seine et Honfleur (PK 355) est toujours salé et est principalement influencé par la mer. Bien que les apports d'eau douce soient toujours présents,

notamment en période de crue avec l'expulsion du bouchon vaseux ou exportation des contaminations, MES et MO. L'estuaire moyen, entre Honfleur (PK355) et Vieux Port (PK 325, représentant la limite amont moyenne de l'intrusion saline), est une zone complexe où les caractéristiques des masses d'eau et les processus sont très variables. Il correspond à la zone de mélanges des eaux douces et marines et est généralement le siège du bouchon vaseux. Ses limites sont variables selon les coefficients de marée et le débit de la Seine. L'estuaire amont (ou fluvial) entre Vieux Port et le barrage de Poses (PK 202 ; limite amont de l'estuaire) est marqué par les remontées de la marée dynamique, les eaux y sont donc douces et l'hydrodynamisme fluvial y est dominant.

Le bassin versant de la Seine est influencé par de nombreuses activités industrielles, agricoles et une forte pression urbaine qui se traduisent par d'importants rejets venant des réseaux hydrographiques et des sols. Ces apports anthropiques peuvent altérer la qualité et la composition des eaux sous diverses formes : eutrophisation, présence de contaminants (organiques, inorganiques, micro- et nanoparticules...), de microorganismes pathogènes, de flux de MES et MO (Cachot et al., 2006; Cailleaud et al., 2009; Chiffolleau et al., 2001; Guézennec et al., 1999; Hamzeh et al., 2013; Nguyen et al., 2013; Tamtam et al., 2008; Togola and Budzinski, 2007a, 2007b; Verney et al., 2009). De plus les apports de nutriments tels que l'azote ou le phosphore et de MO vont jouer un rôle important pour les blooms phytoplanctoniques en baie de Seine. Les apports agricoles en termes de MO s'ajoutent aux sources anthropiques le long du fleuve et de l'estuaire.

Le transport de MES dans l'estuaire est annuellement relativement faible, environ  $30 \text{ mg.L}^{-1}$ . Ces MES sont principalement composées de matériel silto-vaseux et de composés organiques issus de l'érosion des sols, la production biologique terrestre et aquatique et des activités humaines. Dans la zone de rencontre des eaux salées marines et douces terrestres avec l'effet des courants de marée et de débits se crée une zone turbide d'accumulation des MES, le bouchon vaseux (BV). Il a souvent été considéré comme un régulateur des flux de contaminants (chimiques ou microbiologiques ou bactériologiques) et des processus hydro-sédimentaires au sein de l'estuaire de Seine (Chiffolleau et al., 2001; Garnier et al., 2010, 2008; Tournon et al., 2007). Les MES peuvent provenir des apports de l'amont par la Seine et des apports intra-estuariens par les ruissellements et des dépôts atmosphériques (Deloffre et al., 2006, 2005; Hir et al., 2001; Mikes et al., 2004). Cependant environ 70 à 80 % des apports en MES sont issus du bassin versant en amont du barrage de Poses alors que les apports intra-estuariens peuvent représenter jusqu'à 30 %. Les apports marins sont quant à eux difficilement quantifiables (Guézennec et al., 1999; Mikes et al., 2004; Verney et al., 2006).

La Figure II-7 permet d'illustrer les différences engendrées par les effets de la marée sur la salinité moyenne, sur la colonne d'eau et sur le plan vertical, et sur les matières en suspension moyennes sur la colonne d'eau. En pleine mer, les eaux marines remontent dans l'estuaire avec un déplacement plus

important en profondeur de la colonne d'eau. Les MES se retrouvent principalement très haut dans l'estuaire (PK 340), alors qu'en basse mer, les eaux terrestres chargées en MES viennent se mélanger aux eaux marines dans l'estuaire (environ PK 355). Sur le plan vertical les différences s'amouindrissent. Cependant selon les conditions de marée (coefficients et houles) et climatiques (pluviométrie), les mouvements des masses d'eau peuvent être très différents.

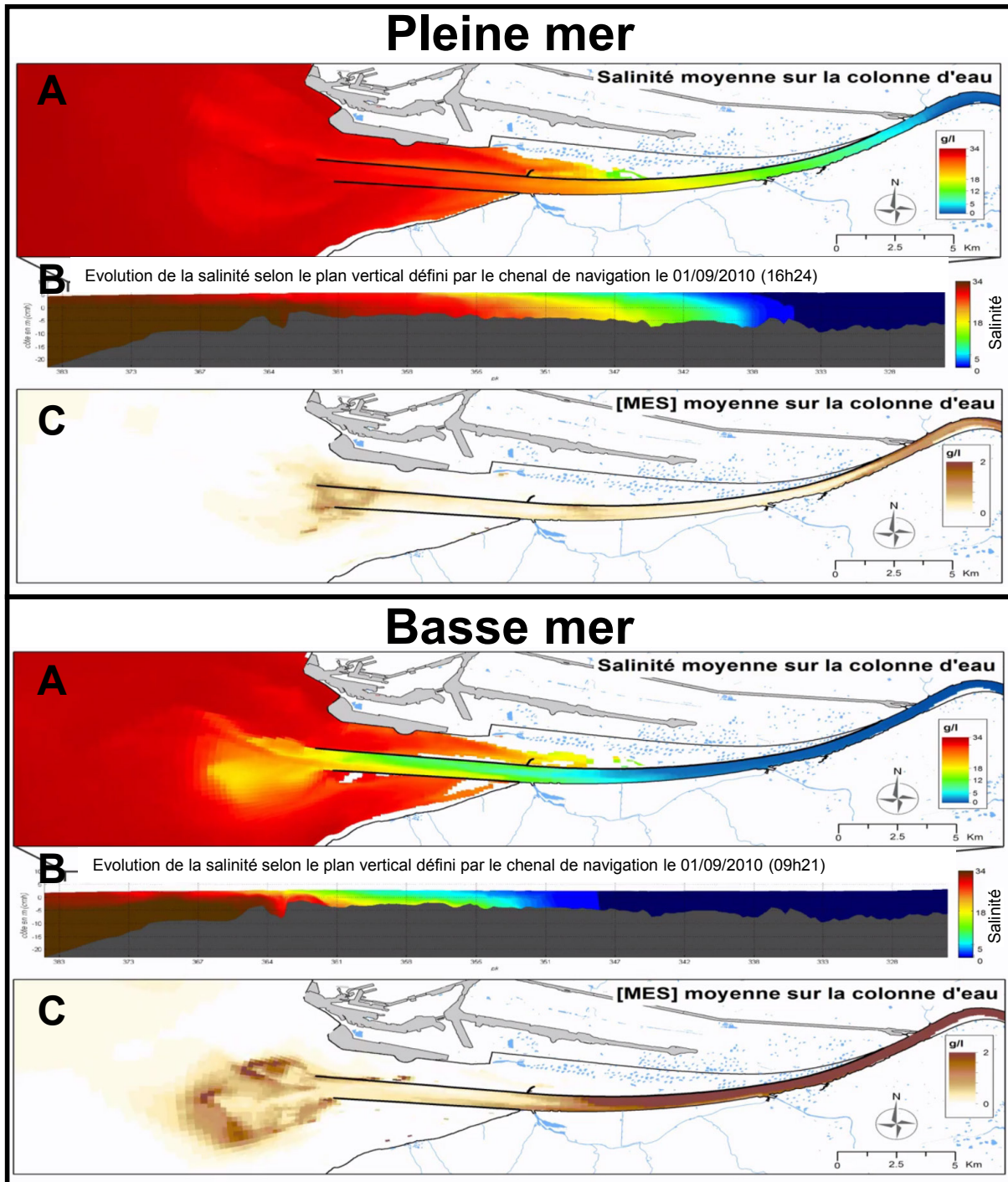


Figure II-7: Comparaison de la salinité moyenne sur la colonne d'eau (A), de la salinité moyenne sur un transect vertical (B) et des MES sur la colonne d'eau (C) entre la pleine mer et la basse mer (le 01/09/2010) (source: GIP Seine Aval)



Le projet MOSAIC (dynamique de Matière Organique dans le bouchon vaSeux de l'estuaire de Seine en lien avec les nutriments et les Contaminants organiques), financé dans le cadre de la phase 5 du programme Seine-Aval vise notamment à déterminer les caractéristiques globales et structurales de la MO dans les compartiments dissous/colloïdal, particulaire et sédimentaire du BV, ainsi qu'en amont et en aval de ce dernier, ceci afin d'étudier l'influence des modifications qualitatives et quantitatives de la MO sur la dynamique des contaminants et des nutriments. Au total 5 campagnes de prélèvements ont été effectuées en estuaire de Seine entre 2015 et 2016 dans le cadre de ce projet.

Les prélèvements d'eaux effectués au cours des campagnes de Septembre 2015 et Avril 2016 ont été plus particulièrement étudiés dans le cadre de cette thèse, soit un total de 62 échantillons (Tableau II-2). Les prélèvements étudiés ici ont été principalement réalisés pour 5 sites d'échantillonnage (Caudebec, Tancarville, Fatouville, Honfleur et La Carosse ; Figure II-8) à deux profondeurs (surface et fond) en station fixe afin de pouvoir échantillonner au cours du cycle de marée. De plus pour la campagne d'Avril 2016 un transect entre Caudebec à Rouen a également été réalisé (14 sites de prélèvement de surface ; Figure II-8).

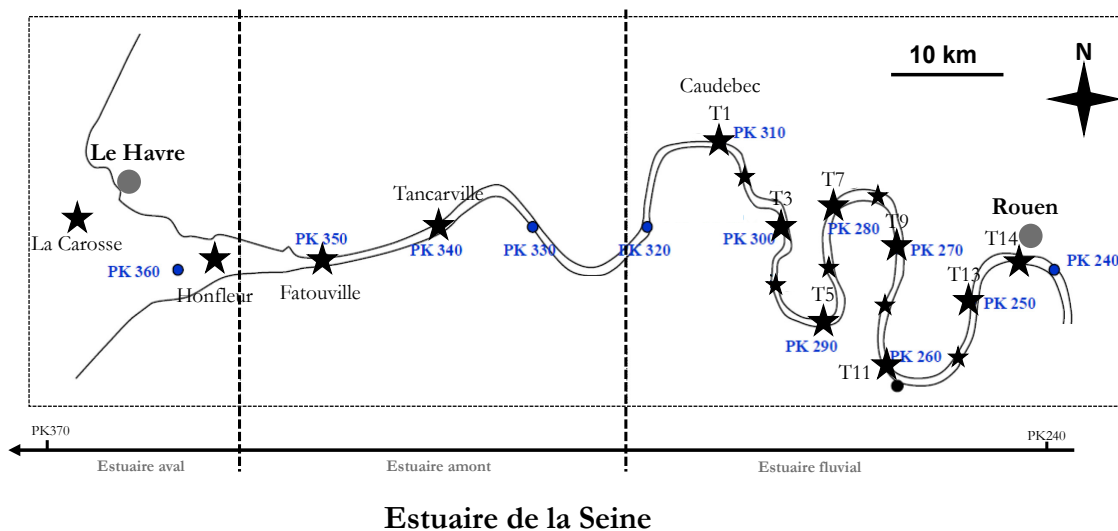


Figure II-8: Carte générale de l'estuaire de la Seine avec la position des sites de prélèvement (PK: point kilométrique, distance en kilomètres depuis le Pont Marie à Paris)

Tableau II-2: Liste des échantillons étudiés dans l'estuaire de la Seine

NOM	SAISON	POSITION	SITE	POSITION DE MAREE	SALINITE	TEMPERATURE
TT 1 S	avr-16	Surface	Tancarville	MARÉE BASSE	0	13
TT 2 S	avr-16	Surface	Tancarville	JUSANT	0	13
TT 3 S	avr-16	Surface	Tancarville	MARÉE HAUTE	1	13
TT 1 B	avr-16	Fond	Tancarville	MARÉE BASSE	0	13
TT 2 B	avr-16	Fond	Tancarville	JUSANT	0	13
TT 3 B	avr-16	Fond	Tancarville	MARÉE HAUTE	1	13
BT 1 S	avr-16	Surface	Fatouville	MARÉE BASSE	0	13
BT 2 S	avr-16	Surface	Fatouville	JUSANT	5	13
BT 3 S	avr-16	Surface	Fatouville	MARÉE HAUTE	12	12
BT 1 B	avr-16	Fond	Fatouville	MARÉE BASSE	0	13
BT 2 B	avr-16	Fond	Fatouville	JUSANT	8	12
BT 3 B	avr-16	Fond	Fatouville	MARÉE HAUTE	21	11
HT 1 S	avr-16	Surface	Honfleur	MARÉE BASSE	1	13
HT 2 S	avr-16	Surface	Honfleur	JUSANT	6	13
HT 3 S	avr-16	Surface	Honfleur	MARÉE HAUTE	19	12
HT 1 B	avr-16	Fond	Honfleur	MARÉE BASSE	1	13
HT 2 B	avr-16	Fond	Honfleur	JUSANT	6	13
HT 3 B	avr-16	Fond	Honfleur	MARÉE HAUTE	26	11
LCT 1 S	avr-16	Surface	La Carosse	MARÉE BASSE	31	10
LCT 2 S	avr-16	Surface	La Carosse	JUSANT	33	10
LCT 3 S	avr-16	Surface	La Carosse	MARÉE HAUTE	32	10
LCT 1 B	avr-16	Fond	La Carosse	MARÉE BASSE	33	10
LCT 2 B	avr-16	Fond	La Carosse	JUSANT	33	10
LCT 3 B	avr-16	Fond	La Carosse	MARÉE HAUTE	33	10
T 1 S	avr-16	Surface	Transect		0	14
T 2 S	avr-16	Surface	Transect		0	14
T 3 S	avr-16	Surface	Transect		0	14
T 4 S	avr-16	Surface	Transect		0	14
T 5 S	avr-16	Surface	Transect		0	14
T 6 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 7 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 8 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 9 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 10 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 11 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 12 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 13 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
T 14 S	avr-16	Surface	Transect		0	13
CT1SS	sept-15	Surface	Caudebec	MARÉE BASSE	0	17
CT2SS	sept-15	Surface	Caudebec	JUSANT	0	17
CT3SS	sept-15	Surface	Caudebec	MARÉE HAUTE	0	17
TT1SS	sept-15	Surface	Tancarville	MARÉE BASSE	1	17
TT2SS	sept-15	Surface	Tancarville	JUSANT	2	16
TT3SS	sept-15	Surface	Tancarville	MARÉE HAUTE	11	17
FT1SS	sept-15	Surface	Fatouville	MARÉE BASSE	2	17
FT2SS	sept-15	Surface	Fatouville	JUSANT	14	16
FT3SS	sept-15	Surface	Fatouville	MARÉE HAUTE	19	17
HT1SS	sept-15	Surface	Honfleur	MARÉE BASSE	6	17
HT2SS	sept-15	Surface	Honfleur	JUSANT	16	17
HT3SS	sept-15	Surface	Honfleur	MARÉE HAUTE	21	17
CT1FS	sept-15	Fond	Caudebec	MARÉE BASSE	0	17
CT2FS	sept-15	Fond	Caudebec	JUSANT	0	17
CT3FS	sept-15	Fond	Caudebec	MARÉE HAUTE	0	17
TT1FS	sept-15	Fond	Tancarville	MARÉE BASSE	1	17
TT2FS	sept-15	Fond	Tancarville	JUSANT	3	16
TT3FS	sept-15	Fond	Tancarville	MARÉE HAUTE	19	17
FT1FS	sept-15	Fond	Fatouville	MARÉE BASSE	2	17
FT2FS	sept-15	Fond	Fatouville	JUSANT	17	16
FT3FS	sept-15	Fond	Fatouville	MARÉE HAUTE	25	16
HT1FS	sept-15	Fond	Honfleur	MARÉE BASSE	7	17
HT2FS	sept-15	Fond	Honfleur	JUSANT	18	16
HT3FS	sept-15	Fond	Honfleur	MARÉE HAUTE	25	17

### 3 Biarritz – Golfe de Gascogne

Dans le cadre du projet PERMALA (PERTurbations et Milieux Aquatiques Littoraux Aquitains) visant à étudier l'origine, la formation et l'évolution d'une substance visqueuse dans les eaux du Golfe de Gascogne, des campagnes d'échantillonnage ont été réalisées entre avril 2013 et juin 2014 en zone côtière (en face de Biarritz et Tarnos) ainsi que dans le fleuve Adour (Figure II-9). Dans le cadre de cette thèse, trois échantillons (Tableau II-3) prélevés en juin 2013 en sub-surface (1m de profondeur) ont été utilisés afin de comparer les tailles moléculaires de MOD prélevée en zone océanique. Ces trois échantillons ont été choisis afin de pouvoir comparer des MOD en zone côtière sous différentes influences par rapport à l'estuaire de la Gironde sur la façade Atlantique.

Tableau II-3: Liste des échantillons provenant de Biarritz

NOM	DATE DE PRELEVEMENT	POSITION	SITE	SALINITE
B1	06/06/13	Surface	Biarritz	31,3
B2	12/06/13	Surface	Biarritz	30
B3	04/06/13	Surface	Biarritz	30,8



Figure II-9: Carte du Golfe de Gascogne et zoom sur les zones de prélèvements en face de Biarritz

## 4 Arcachon

Le projet OSQUAR-2 (OStréiculture et QUalité du milieu : approche dynamique du Bassin d’Arcachon) visait, entre autres, à réaliser un suivi intensif (2012-2014) par fluorescence de la MOD des eaux du Bassin d’Arcachon et de ses principaux tributaires afin de mieux cerner les variabilités spatiales et temporelles de la MOD tant d’un point de vue qualitatif que quantitatif. Dans le cadre de ces travaux de thèse, trois échantillons (Tableau II-4) prélevés en septembre 2014 au sein du Bassin d’Arcachon (Figure II-10) ont été étudiés afin de comparer les tailles moléculaires de la MOD prélevées à celles mesurées pour les échantillons en zones océaniques et estuariennes.

Tableau II-4: Liste des échantillons provenant du Bassin d’Arcachon

NOM	DATE DE PRELEVEMENT	POSITION	SITE	SALINITE
A1	10/09/14	Surface	Grand Banc	34,21
A2	10/09/14	Surface	Comprian	28,6
A3	10/09/14	Surface	Arguin	35

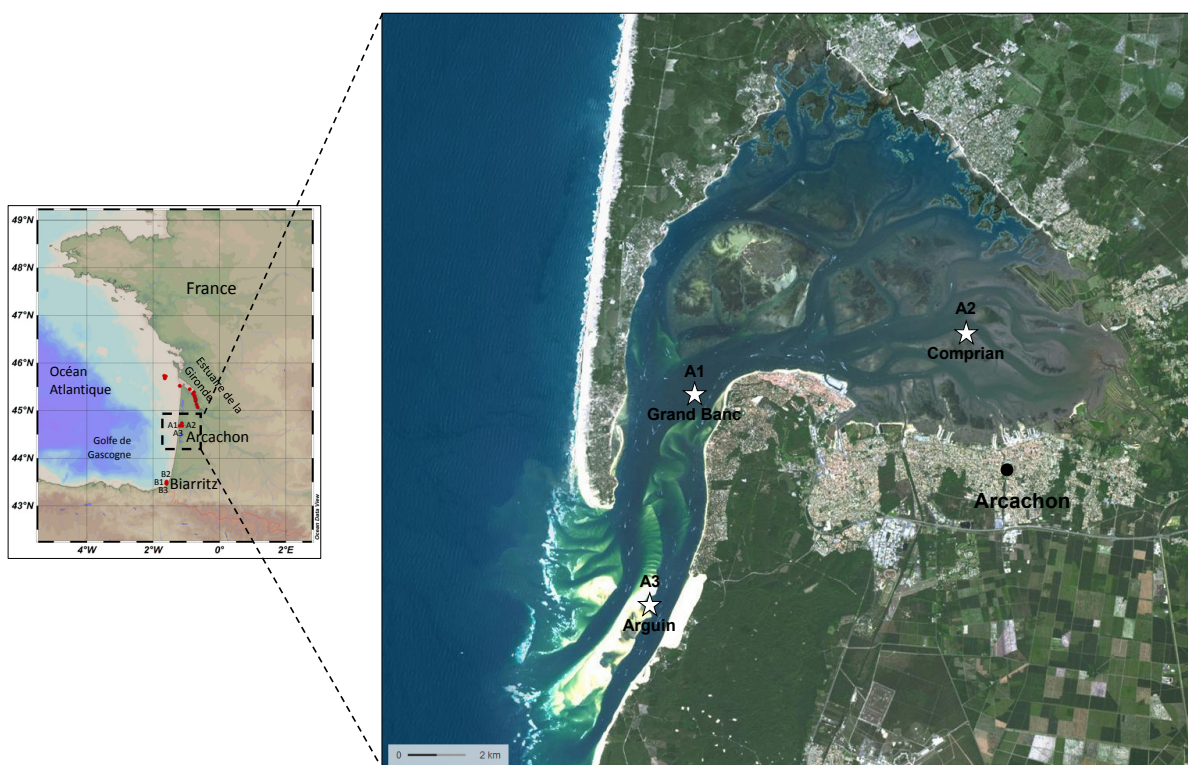


Figure II-10: Carte du Golfe de Gascogne et zoom sur les sites de prélèvements dans le Bassin d’Arcachon

## II Outils et méthodes utilisés

Dans cette partie sont détaillées les différentes techniques analytiques utilisées afin de caractériser la matière organique dissoute en milieu naturel aquatique.

Ces travaux de thèse se caractérisent par l'utilisation de plusieurs outils analytiques complémentaires pour atteindre divers objectifs. Les techniques de fractionnement et d'analyses de la matière organique dissoute par fractionnement par couplage flux/force ont permis sa caractérisation en taille et type. Les techniques spectroscopiques qui ont été utilisées sont ensuite explicitées.

### 1 Préparation des échantillons :

Les échantillons d'eaux naturelles ont été filtrés immédiatement après leur prélèvement sur filtres en fibre de verre Whatman GF/F (0,70  $\mu\text{m}$ ) préalablement pyrolysés à 450 °C pendant 1 heure. Cette filtration permet de séparer la phase particulaire qui reste sur le filtre de la phase dissoute/colloïdale. Les échantillons filtrés ont ensuite été stockés à 4°C et à l'abri de la lumière avant leurs analyses.

### 2 Technique de fractionnement par couplage flux/force

Les techniques de fractionnement par couplage flux/force (Field-Flow Fractionation, FFF) ont été développées par Giddings au sein de l'Université de Salt Lake City (USA) dans les années 1970-1980. Ces techniques permettent la séparation de molécules et macromolécules sur une large gamme de tailles pouvant aller de quelques nanomètres à plusieurs micromètres. Avec l'explosion des études sur des objets aux échelles nanométriques ces techniques ont connu un net regain d'intérêt depuis quelques années.

La principale différence de la FFF par rapport aux techniques chromatographiques en phase liquide « classique » repose sur le fait que son principe de séparation ne se base pas sur des interactions entre particules, phase mobile et phase stationnaire. Les particules sont portées par une phase mobile liquide mais la séparation se fait dans un liquide grâce à un champ de force perpendiculaire au canal, dans lequel l'échantillon circule et où la séparation a lieu. L'absence d'interaction entre la phase stationnaire et les particules, dans les conditions optimales, permet de limiter au maximum les phénomènes physico-chimiques pouvant entraîner une modification ou une destruction des molécules. La séparation en FFF est donc basée en grande partie sur des interactions physiques entre solutés et forces appliquées.

La technique basée sur une force fluïdique est appelée « Flow Field Flow Fractionation » (FIFFF), elle permet de séparer une gamme de taille allant de 1 nm à 100 µm. Cette technique est séparée en deux grandes familles selon le type de force fluïdique et la géométrie du canal, la FIFFF symétrique et asymétrique. Parmi l'ensemble des techniques de fractionnement dites de FIFFF, on retrouve donc le fractionnement par couplage flux/force avec flux asymétrique. Sa gamme d'application s'étend des macromolécules, simples ou complexes, d'importance biologique, pharmaceutique, industrielle ou environnementale (Alasonati et al., 2007, 2006; Barahona et al., 2015; Guéguen and Cuss, 2011; Malik and Pasch, 2016; Moquin et al., 2014; Wagner et al., 2014a, 2014b). La Figure II-11 montre bien l'évolution de l'utilisation de l'AF4 depuis sa création jusqu'à aujourd'hui, une nette augmentation au début des années 2000 peut être associée à l'avènement des nanoparticules.

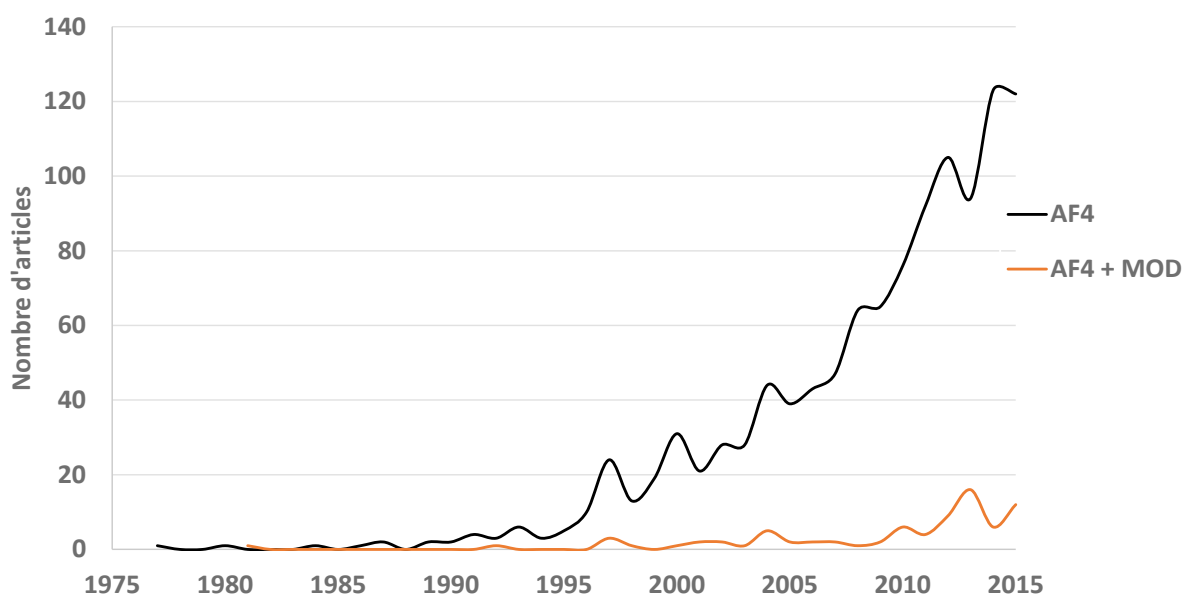


Figure II-11: Evolution du nombre d'articles publiés dans des revues de rang A utilisant l'AF4 (noir) et utilisant l'AF4 pour l'étude de la MOD (orange) (source: Scopus)

Le fractionnement par AF4 est basé sur une séparation en fonction du coefficient de diffusion des particules à séparer, ce coefficient est ensuite transformé en taille de particules. La séparation par flux asymétrique permet de séparer plus rapidement les molécules et de réduire les phénomènes de dilution, souvent problématiques lors de l'étude environnementale à faible concentration. L'AF4 a donc été principalement utilisée au cours de ces travaux de thèse dans le but de séparer puis caractériser la matière organique dissoute et colloïdale en milieu aquatique naturel. De plus l'AF4 présente l'avantage par rapport aux autres techniques de FFF que la nature de la force utilisée pour le fractionnement (cross-flow) peut avoir un effet sur toutes les particules (Wahlund et al., 1987). Ceci fait de l'AF4 la technique de FFF la plus universelle.

## *a Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AF4)*

### *i Principe et appareillage*

Cette technique repose sur l'application d'un second flux de phase mobile (différent de celui de l'élution) qui exerce une force perpendiculaire appelé flux croisé (ou cross flow) (Schimpf et al., 2000) (Figure II-12). Ce flux asymétrique est généré par une différence de pression à travers la paroi semi-perméable (frittée) constituant le bloc inférieur du canal de séparation (Figure II-13).

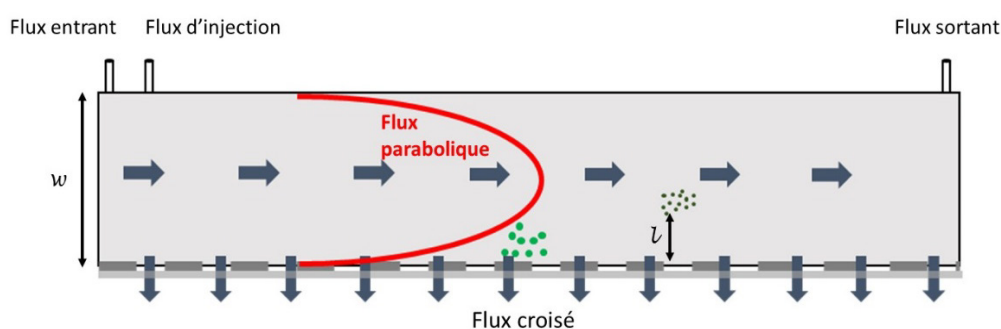


Figure II-12: Schéma d'un canal AF4 avec les différents flux ( $w$ : l'épaisseur du canal et  $l$ : la distance entre la particule et la membrane)

Une des particularités de l'AF4 par rapport à la chromatographie liquide classique repose dans l'utilisation d'un canal de séparation (Figure II-13) constitué de :

- un bloc supérieur imperméable
- un bloc inférieur perméable doté d'un fritté
- une membrane type ultrafiltration déposée sur le fritté et à travers laquelle une fraction de la phase mobile va pouvoir passer par un effet de pression, le *cross-flow*. Elle détermine la limite inférieure de taille des échantillons (membranes en cellulose régénérée, en polyethersulfone, etc.), les molécules de taille inférieure à la membrane peuvent donc passer au travers et rejoindre généralement la poubelle.
- un espaceur de forme trapézoïdale et composé de mylar, est déposé sur la membrane et pris entre les deux blocs. L'épaisseur de cet espaceur détermine le volume disponible de la zone de fractionnement du canal. L'épaisseur peut varier entre 125 et 490  $\mu\text{m}$  ainsi que sa forme qui peut être plus ou moins large selon les échantillons et les objectifs de l'étude.

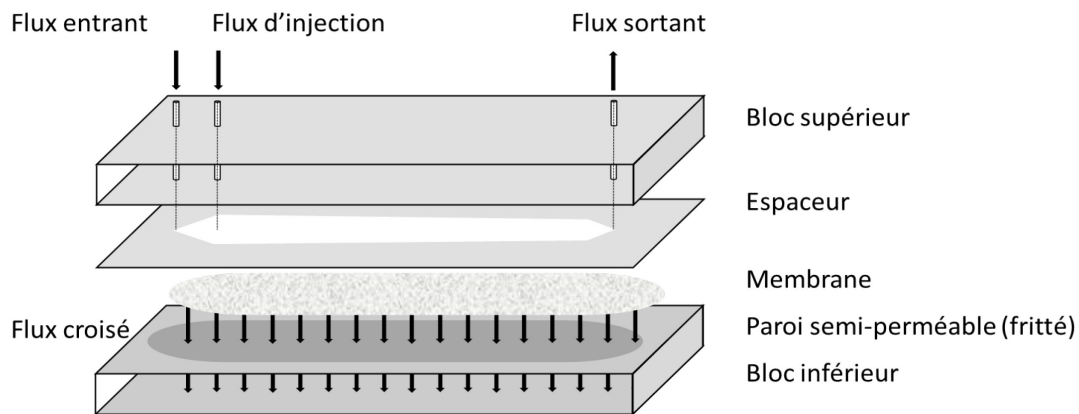


Figure II-13: Représentation d'un canal AF4

## ii Théorie du fractionnement par AF4

Tout d'abord il faut savoir que la séparation des particules par AF4 dans un canal a lieu en fonction du coefficient de diffusion de ces particules. En effet, plus les particules peuvent diffuser vers le centre du canal (loin de la membrane), donc dans le sens contraire du flux croisé appliqué, plus elles sont soumises à un flux d'éluion « rapide » étant donné que ce flux est parabolique (Figure II-12). La capacité d'une particule à diffuser vers le centre du canal augmente donc avec son coefficient de diffusion.

Les éléments de théorie expliqués ci-après concernant les techniques AF4 sont bien connues et issues principalement du « FFF Handbook » de Schimpf et al. (2000).

Le but de cette partie théorie est de présenter les principales équations relatives aux techniques FFF afin de bien comprendre la technique et de mieux optimiser son utilisation.

Tout d'abord afin d'estimer l'influence du flux croisé sur la répartition des particules dans l'épaisseur du canal, il est nécessaire d'évaluer la concentration d'une particule  $c(x)$  à une distance  $x$  de la membrane. Cette concentration peut être définie selon l'Équation II-1 :

Équation II-1

$$c(x) = c_0 \cdot e^{\left(-\frac{|F|x}{kT}\right)} \text{ (en mol.m}^{-3}\text{)}$$

- Avec :
- $c_0$  : concentration d'une particule sur la paroi d'accumulation ( $x=0$ ) ( $\text{mol.m}^{-3}$ )
  - $F$  : force appliquée (flux croisé) ( $\text{Newton ou kg.m.s}^{-2}$ )
  - $x$  : distance de la membrane à la particule (m)
  - $k$  : constante de Boltzmann ( $k=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$ )
  - $T$  : température (K)



Cette équation simplifiée permet de voir que la concentration  $c(x)$  d'une particule à une distance  $x$  est dépendante de façon exponentielle du flux croisé (force appliquée) et de la distance  $x$ . La concentration aura donc tendance à diminuer rapidement avec l'augmentation du flux croisé. Le flux croisé a donc un rôle déterminant dans la position des particules dans le canal (épaisseur) et donc pour leur élution, étant donné que le flux d'élution a un profil parabolique.

De plus, deux paramètres communs à toutes les techniques FFF sont essentiels à définir afin de relier la rétention d'un composé au concept explicité précédemment : le rapport de rétention  $R$  et le paramètre de rétention  $\lambda$ .

Le rapport de rétention  $R$  est un facteur physique, il permet de décrire le retard d'élution d'une particule sous l'effet de la compression (pression) engendrée par l'effet du flux croisé. Il est défini par l'Équation II-2 :

Équation II-2

$$R = \frac{t_0}{t_R} = \frac{V_0}{V_R}$$

- Avec :
- $t_0$  : temps mort (s)
  - $t_R$  : temps de rétention du composé considéré (s)
  - $V_0$  : volume mort ( $m^3$ )
  - $V_R$  : volume de rétention du composé considéré ( $m^3$ )

La Figure II-14 permet de voir la correspondance de  $t_0$  et  $t_R$  sur un fractogramme.

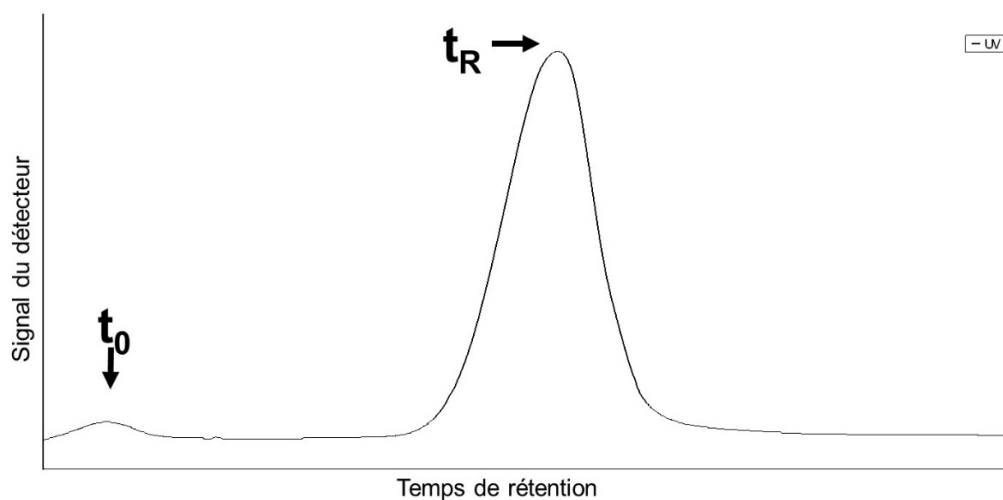


Figure II-14 : Exemple de fractogramme d'AF4 avec la mise en avant de  $t_0$  et  $t_R$

Le paramètre de rétention  $\lambda$  exprime le degré de compression (toujours positif) de la particule dans le canal : plus la force exercée par le flux croisé sur les particules est grande, moins les particules sont dispersées. Le paramètre  $\lambda$  est également relié aux caractéristiques directes des particules, ce qui

détermine son degré d'interaction avec le flux croisé. Il est possible d'exprimer  $\lambda$  par de nombreuses équations (exemple en Équation II-3).

Équation II-3

$$\lambda = \frac{kT}{|F|w}$$

Avec :  $k$  : constante de Boltzmann ( $k=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

$w$  : épaisseur du canal (m)

$F$  : force appliquée (flux croisé) (Newton ou  $\text{kg.m.s}^{-2}$ )

Et après une succession d'équations se substituant les unes aux autres,  $\lambda$  peut être exprimé sous la forme (Équation II-4) :

Équation II-4

$$\lambda = \frac{kTV_0}{fV_c w^2}$$

Avec :  $V_0$  : volume mort ( $\text{m}^3$ )

$k$  : constante de Boltzmann ( $k=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

$V_c$  : débit du flux croisé ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ )

$f$  : coefficient de friction des particules ( $\text{kg.s}^{-1}$ )

$w$  : épaisseur du canal (m)

De plus, le paramètre de rétention  $\lambda$  peut être déterminé à l'aide de l'équation de Nernst Einstein en fonction du coefficient de diffusion puis avec la loi de Stokes qui permet de relier le coefficient de friction au diamètre hydrodynamique  $d_h$ . Il est *in fine* possible d'exprimer  $\lambda$  en fonction de  $d_h$  (Équation II-5) :

Équation II-5

$$\lambda = \frac{kTV_0}{6\pi\eta V_c w^2 R_h}$$

Avec :  $k$  : constante de Boltzmann ( $k=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

$V_0$  : volume mort ( $\text{m}^3$ )

$\eta$  : viscosité de la phase mobile ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )

$V_c$  : flux croisé ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ )

$w$  : épaisseur du canal (m)

$R_h$  : rayon hydrodynamique de la particule (m)

Enfin il est possible de relier les paramètres physico-chimiques inclus dans l'expression du paramètre de rétention  $\lambda$  aux paramètres expérimentaux que contient le rapport de rétention R, ainsi la relation fondamentale proposée par Giddings en 1976 puis Schimpf en 2000 (Giddings et al., 1976; Schimpf et al., 2000) permet de relier  $\lambda$  à R par la relation définie en Équation II-6 :

Équation II-6

$$R = 6\lambda \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 12\lambda^2$$

Afin de résoudre l'équation reliant  $\lambda$  à R, il est nécessaire de réaliser plusieurs approximations pour obtenir une relation plus simple d'utilisation. L'approximation généralement utilisée est celle qui permet de déterminer  $\lambda$  en fonction de R, lorsque R peut être déterminé expérimentalement (Équation II-7)

Équation II-7

$$\lambda = \frac{R}{6(1-R)^{1/3}}$$

Il est important de noter que cette équation est précise à 4 % près quand  $R < 0,2$ .

Toutes les équations reliant R à  $\lambda$  mettent en évidence le fait que le temps de rétention  $t_R$  et le rayon hydrodynamique  $R_H$  sont dépendants l'un de l'autre. En utilisant les équations précédentes, la relation reliant  $t_R$  à  $R_H$  obtenue est l'Équation II-8 :

Équation II-8

$$t_R = \frac{\pi\eta d_h V_c w^2 t_0}{kTV_0} \text{ (s)}$$

Avec :  $k$  : constante de Boltzmann ( $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

$\eta$  : viscosité de la phase mobile ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )

$d_h$  : diamètre hydrodynamique (m)

$V_0$  : volume mort ( $\text{m}^3$ )

$V_c$  : flux croisé ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ )

$t_0$  : temps mort (s)

$t_R$  : temps de rétention du composé considéré (s)

$w$  : épaisseur du canal (m)

Grâce à cette équation (Équation II-8) il est possible de voir que lorsque le flux croisé est constant, la relation entre le temps de rétention et le rayon hydrodynamique est linéaire (lorsque le temps de rétention est suffisamment grand). Cette relation est primordiale car elle a l'avantage de permettre de vérifier que le fractionnement est effectif et valide lors de manipulations expérimentales. Pour ce faire,

il est possible d'utiliser des étalons de tailles (rayons hydrodynamiques) connus et de tracer  $t_r$  en fonction de  $R_h$ . La droite obtenue renseigne donc sur la qualité de la séparation.

De plus dans le cas d'une élution en mode normal (cas le plus courant en AF4), le fractionnement est sous l'influence directe du coefficient de diffusion des particules et de leur rayon hydrodynamique. Il est possible de donner à partir des équations précédentes une équation (Équation II-9) reliant directement le rayon hydrodynamique  $R_h$  avec le rapport de rétention  $R$  (Giddings et al., 1976; Schimpf et al., 2000) :

*Équation II-9*

$$R_h = \frac{kTV_0}{\pi\eta V_c w^2} \frac{(1-R)^{1/3}}{R}$$

Pour finir, il est possible de mettre en évidence l'influence directe du flux croisé  $V_c$  et d'élution  $V$  sur le temps de rétention  $t_r$  de façon théorique. Cependant dans un système asymétrique AF4, la diminution du débit de flux d'élution due à l'application du débit de flux croisé (passant au travers de la membrane) doit en plus être prise en compte. De plus il faut prendre en considération la géométrie du canal, l'équation simplifiée obtenue est l'Équation II-10 qui relie donc le temps de rétention avec les débits de flux croisé et d'élution :

*Équation II-10*

$$t_R \cong \frac{1}{6D} w^2 \cdot \ln \left[ 1 + \frac{V_c}{V} \right]$$

Il faut noter que cette équation n'est valable que dans le cas où  $R$  est inférieur à 0,1. Elle permet de mettre en évidence que l'élution, et donc la séparation dans un canal d'AF4, dépend du rapport du flux croisé sur le flux d'élution,  $V_c/V$ . Ainsi dans un but d'optimiser la séparation, il apparaît crucial de prendre en considération le couple de flux croisé – flux d'élution.

La distance  $l$  entre une particule et la paroi d'accumulation (la membrane), dans des conditions de séparation identique, ne dépend que de propriétés intrinsèques de la particule (coefficient de diffusion) et de la force appliquée (flux d'élution et flux croisé). Cette équation met en valeur l'importance de l'épaisseur du canal dans l'élution des particules. En raison du profil parabolique du flux d'élution (Figure II-15) la vitesse d'élution ne sera pas la même en fonction de la position dans l'épaisseur du canal.

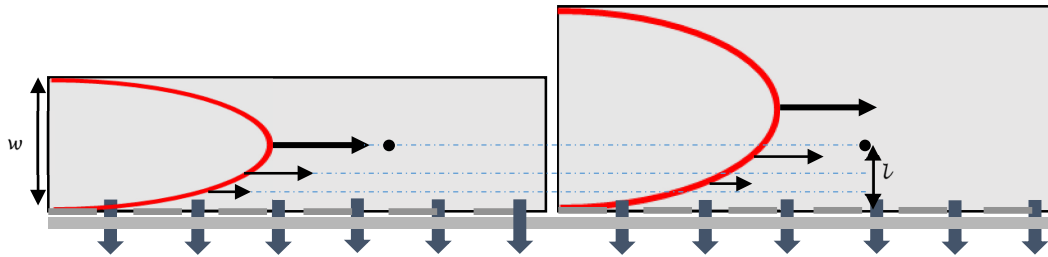


Figure II-15: Illustration schématique de la dépendance de l'élution en fonction de l'épaisseur du canal (à flux croisé constant).

Il est important de rappeler que l'ensemble de ces équations développées dans cette partie ne sont valables que lorsque l'élution lors du fractionnement par AF4 a lieu en mode normal. Mais il existe trois modes d'élution différents possibles en AF4.

### iii Modes d'élution possibles en AF4

Dans une séparation par AF4, il existe trois modes d'élution possibles dépendant principalement du type et de la taille des particules analysées ainsi que de la force du flux croisé (Beckett et al., 1987a; Koch and Giddings, 1986; Schimpf et al., 2000).

- Le mode normal ou Brownien qui utilise la capacité des particules à diffuser contre le flux appliqué (flux croisé) et donc sépare les particules selon leur coefficient de diffusion. Plus les particules ont un coefficient de diffusion élevé, plus elles vont avoir tendance à diffuser contre le flux croisé (Figure II-16). D'autre part, la taille et la diffusion des particules sont reliées, une particule diffuse plus vers le centre du canal quand sa taille est plus petite (Figure II-16). En raison du flux parabolique, l'élution des particules dans le canal se fait donc par ordre croissant de taille, les plus « petites » vont donc être éluées et sortir du canal en premier alors que les plus « grandes » sont éluées en dernier. Ces particules de tailles différentes vont se répartir dans la hauteur du canal selon leur gradient de diffusion (Figure II-17), cependant il n'utilise que le quart du canal. La filtration des échantillons étudiés dans ce travail a été effectuée avec un seuil de coupure de  $0,70 \mu\text{m}$  ce qui exclut tout autre mode de séparation.

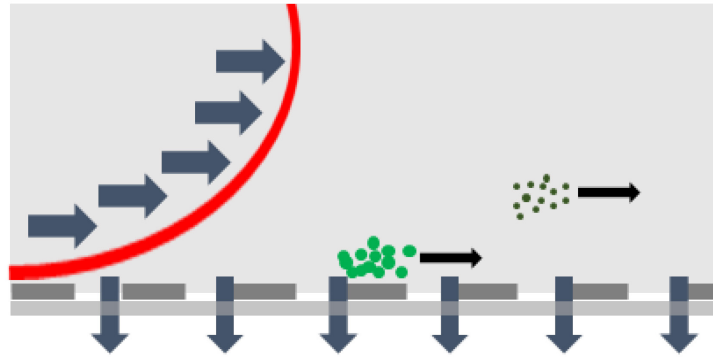


Figure II-16: Représentation du mode normal d'éluion en AF4

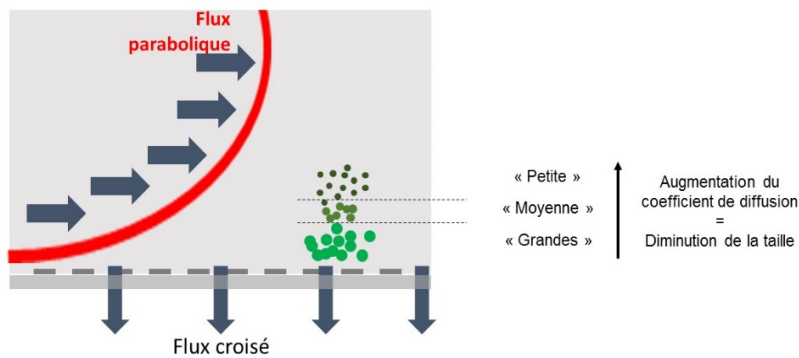


Figure II-17: Disposition verticale des particules de tailles différentes dans une coupe transversale schématique d'un canal d'AF4

- Le mode stérique (Figure II-18) est appliqué aux molécules de plus grandes tailles. Quand la diffusion devient négligeable dans le canal (en raison d'un diamètre des molécules trop grand) par rapport au champ de forces appliquées. Les particules se retrouvent donc proches de la membrane, il n'y a plus de diffusion verticale (Figure II-18). La force à prendre en considération devient donc la force de répulsion exercée par la membrane sur les particules. La position moyenne des particules dans le canal est déterminée ici aussi par leur taille, cependant l'ordre d'éluion est cette fois inverse. Les plus « grandes » molécules vont être éluées et sortir du canal en premier puis les plus « petites ». Ce mode s'applique aux molécules ayant un diamètre de l'ordre du micromètre.

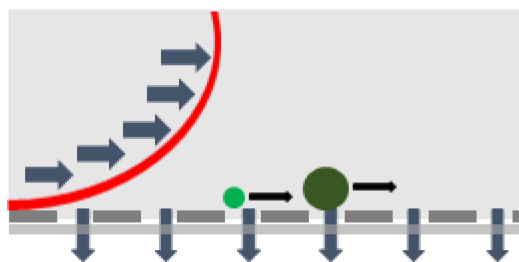


Figure II-18: Représentation du mode d'éluion inverse ou stérique dans une coupe schématique d'un canal AF4

- La séparation de particules de tailles plus importantes (supérieures au micromètre) en mode stérique peut entraîner l'apparition d'une force de répulsion entre les particules et la membrane s'opposant au flux croisé. Ainsi la force de la répulsion est directement dépendante de la taille de la particule. Ce mode d'élution entraîne un ordre de sortie des molécules inverse à celui du mode normal c'est-à-dire dans l'ordre décroissant des tailles. Ce mode est appelé « hyperlayer » (Figure II-19).

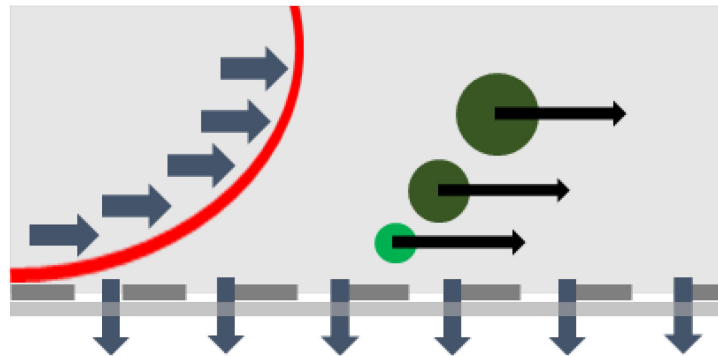


Figure II-19: Représentation du mode d'élution hyperlayer en AF4

En réalité, il existe de grandes similitudes entre les modes stérique et « hyperlayer », ainsi la tendance est à regrouper ces deux modes d'élution et de les nommer sous une appellation commune : mode stérique/« hyperlayer ». Le passage du mode d'élution normal au mode d'élution stérique/« hyperlayer » est communément appelé le phénomène d'inversion. Il est important de bien prendre en compte ce potentiel phénomène dans une séparation car il peut entraîner des complications dans l'interprétation des résultats lors de l'analyse d'un échantillon inconnu et/ou mal préparé. De plus il est même possible d'avoir ces deux modes d'élution simultanément dans le canal. Pour cette raison, entre autres, l'ensemble des échantillons sont filtrés pour éviter de travailler sur un échantillon contenant une gamme de taille trop étendue. De plus le mode d'élution normal permet d'obtenir un fractionnement le plus performant en AF4 (Schimpf et al., 2000).

L'utilisation du mode normal présente l'avantage de pouvoir convertir le temps d'élution de l'analyse en taille, donc d'obtenir un taille moyenne (rayon hydrodynamique ou masse molaire) à partir du fractogramme de séparation.

En utilisant les équations précédemment détaillées et les études précédentes (Dubascoux, 2007; Gimbert et al., 2003), il est possible de relier le temps de rétention  $t_r$  avec le coefficient de diffusion et d'un autre côté le coefficient de diffusion avec la masse moléculaire (Équation II-11) :

Équation II-11

$$D = A \cdot M^b$$

Avec :  $D$  : coefficient de diffusion

$M$  : masse moléculaire (Da)

$A$  et  $b$  : constantes en relation avec le « système » échantillon-phase mobile

Il est finalement possible de tracer une droite d'étalonnage sous la forme de l'Équation II-12 où le temps de rétention  $t_r$ , le coefficient de diffusion  $D$  et la masse moléculaire  $M$  sont directement en relation. Cela permet donc de déterminer la masse moléculaire moyenne d'un échantillon à partir de son fractogramme et d'une droite d'étalonnage.

Équation II-12

$$\log t_r = \log A + b \log M$$

#### iv Les étapes opératoires du fractionnement par AF4

La séparation des particules lors d'une analyse par AF4 se déroule en plusieurs étapes.

##### (d) Injection et Focus

Cette étape consiste à introduire l'échantillon dans le canal de séparation et de le « pré-concentrer ». L'échantillon est introduit dans le canal via une boucle d'injection de volume variable de  $1\mu\text{L}$  jusqu'à quelques millilitres à l'aide d'une seringue d'injection. Le flux d'injection est mélangé avec le flux principal de phase mobile dans le canal, comme indiqué Figure II-20, et associé au flux de focus permettant de commencer la pré-concentration de l'échantillon en tête de canal puis l'échantillon est élué. Le flux de focus correspond à un flux opposé au flux d'élué normal. Il permet d'éviter un effet de dispersion dans le canal des particules (Figure II-20) et donc de concentrer les particules en tête de canal.

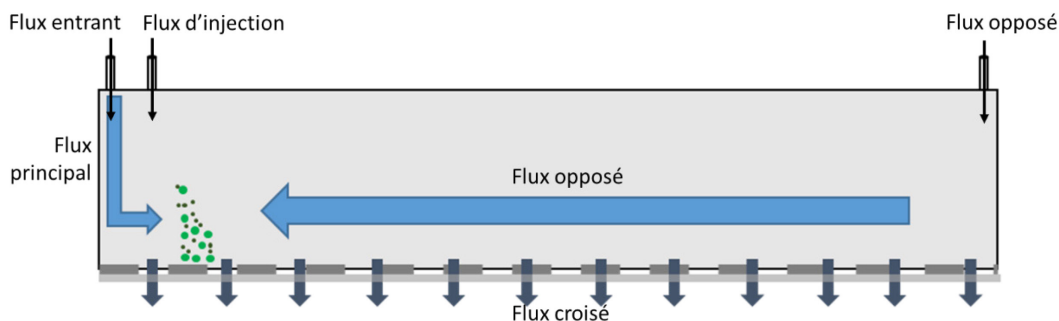


Figure II-20: Etape d'injection et focus



(e) Etape de Focus et relaxation

Après l'étape d'injection et focus (Figure II-21) vient l'étape de focus et relaxation, cette étape a pour but de concentrer les particules en tête de canal et de créer le gradient de diffusion. Le focus se poursuit sans le flux d'injection durant un laps de temps plus ou moins long selon le type d'échantillon et sa concentration. Ce temps de focus est un paramètre important car il définit la qualité de la concentration et du gradient de diffusion mais il ne doit pas être trop long car il peut entraîner des phénomènes d'interactions particules-particules ou bien particules-membrane voire même des pertes à travers la membrane. Ensuite les particules vont trouver leur « place » dans le canal en fonction du flux croisé et de leur capacité à diffuser dans ce flux, cette étape se nomme la relaxation et définit le gradient de diffusion (Figure II-22).

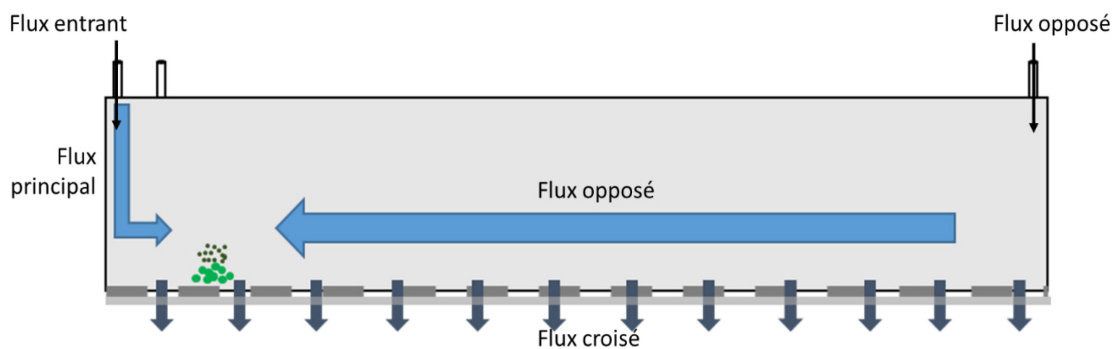


Figure II-21: Etape de focus et relaxation

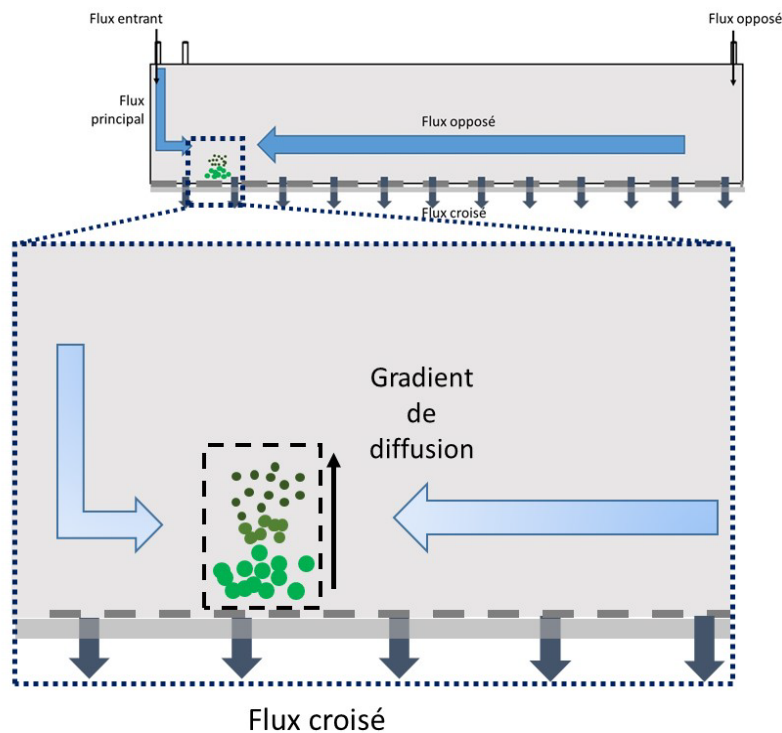


Figure II-22: Zoom schématique de la zone de focus avec formation du gradient de diffusion

### (f) Etape d'éluion

Le flux de focus en sens opposé est enfin arrêté pour laisser place uniquement au flux principal d'éluion et au flux croisé. L'éluion de l'échantillon et donc des particules dans le canal peut alors commencer. Le flux croisé est maintenu afin de préserver la répartition verticale des particules dans l'épaisseur du canal (Figure II-23). Le flux d'éluion parabolique entraine alors les particules préalablement placées selon leur coefficient de diffusion en gradient de diffusion (Figure II-23).

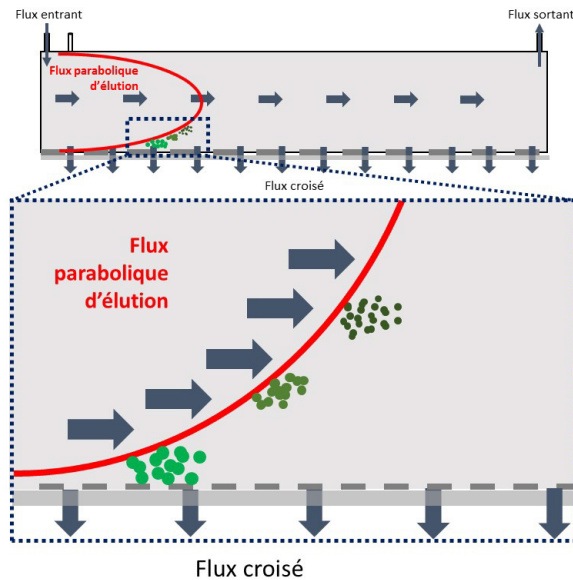


Figure II-23: Zoom schématique de l'éluion dans un canal AF4 avec l'effet du flux d'éluion parabolique sur les particules après la mise en place du gradient de diffusion

Le flux croisé est l'un des paramètres les plus importants au cours de la séparation par AF4 et il peut être appliqué de différentes façons pour optimiser la séparation des particules de l'échantillon (Figure II-24) :

- Flux croisé constant
- Flux succession de plateaux
- Flux croisé décroissant linéaire
- Flux croisé décroissant exponentiel

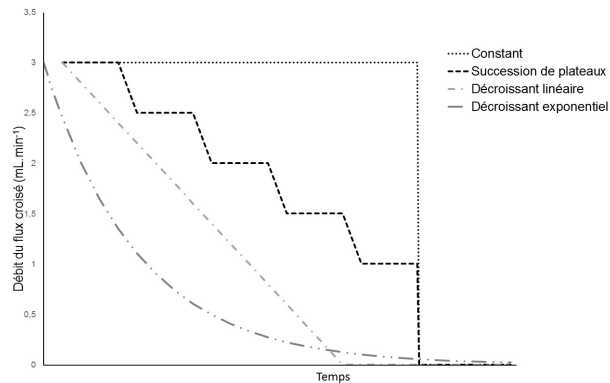


Figure II-24: Schéma des différents flux croisés possibles

## v Les paramètres influençant le fractionnement par AF4

De nombreuses études sur des colloïdes environnementaux (Alasonati et al., 2007; Baalousha et al., 2011; Baalousha and Lead, 2007a; Benincasa, 2002; S. Dubascoux et al., 2008; El Hadri et al., 2014) ont montré l'importance de plusieurs paramètres afin d'obtenir une séparation optimale du mélanges de particules dans un échantillon :

- Volume d'injection
- Temps de focus et relaxation
- Débit des flux d'élution, croisé et de focus
- Epaisseur du canal
- Type et seuil de coupure des membranes
- Phase mobile

### (a) Volume d'injection

Dans un système type AF4, pour conserver l'effet des étapes de focus et relaxation le volume doit être soigneusement calculé (souvent de l'ordre du millilitre ou de la centaine de microlitre). En effet, l'objectif est d'avoir une pré-concentration la plus courte et efficace possible. Il faut donc tenir compte au maximum du volume et de la concentration de la solution ou de l'échantillon à injecter, l'objectif étant de limiter les potentielles interactions particules-particules ou bien particules-membrane et même les pertes à travers la membrane. Selon la quantité de particules injectée, la durée de l'élution peut être modifiée ainsi le temps de rétention peut être augmenté ou diminué (Benincasa and Fratte, 2004; Benincasa, 2002; Martin and Feuillebois, 2003).

### (b) Temps de focus et relaxation

La littérature montre que selon les particules étudiées et les méthodes utilisées la durée du temps de relaxation peut être très variable, allant de la dizaine de secondes à plus de 15 minutes (Guéguen et al., 2013; Mangal and Guéguen, 2015; Stolpe et al., 2010a). On peut donc en déduire que de nombreux paramètres influencent ce temps de relaxation ; en tout premier lieu le type de molécules étudiées, le flux croisé, le flux de focus et les paramètres physico-chimiques de la phase mobile comme le pH et la force ionique. Un temps trop faible ne va pas permettre une pré-concentration et une relaxation optimales des particules alors qu'une durée trop longue peut entraîner des pertes à travers la membrane ou bien des effets d'adsorption sur la membrane ou bien d'agrégation entre les particules (Figure II-25). Les pertes à travers ou sur la membrane se traduisent par un taux de recouvrement

faible (quantité de particules après le fractionnement inférieure à ce qui a été injecté) (Schimpf et al., 2000) de par l'effet du flux croisé associé à la composition de la phase mobile.

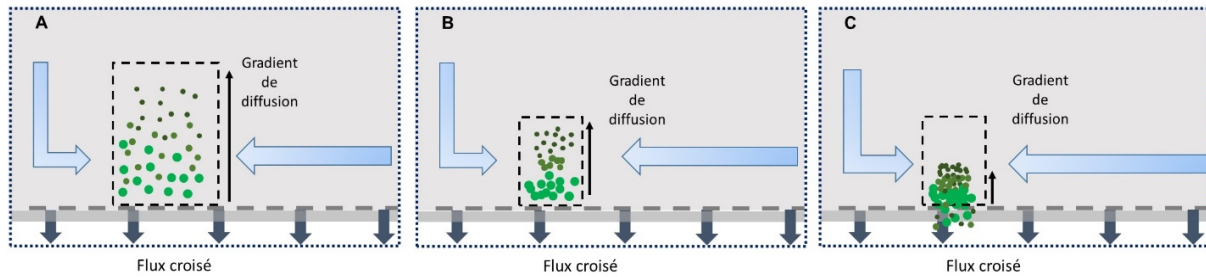


Figure II-25: Zoom schématique sur la formation du gradient de diffusion selon le temps de focus et relaxation dans un canal d'AF4; A: temps « trop court », B: temps « optimale » et C : temps « trop long »

### (c) Débit des flux d'éluion, croisé et de focus

Les débits des flux (éluion, croisé, focus) peuvent avoir de très grandes influences sur la séparation des particules dans le canal. Comme dit précédemment, un flux de focus trop important peut avoir des effets directs sur la séparation. En effet il a tendance à engendrer des interactions particules-particules ou particules-membrane. Alors que le flux croisé va avoir des effets sur la compression des particules sur la membrane durant l'éluion. Lorsque il est trop important, il peut entrainer une trop forte compression des particules ce qui peut engendrer là encore des pertes à travers la membrane, sur la membrane (adsorption), des interactions particules-particules et ainsi une diminution du taux de recouvrement (Hartmann and Williams, 2002; Hassellöv et al., 2007; Schimpf et al., 2000). Hassellöv et al.,(2007) ont montré que dans le cas de la MOD et plus précisément des substances humiques, étant donnée leur petite taille (<10 nm) associée à une bonne capacité à diffuser dans un solvant aqueux, il était nécessaire d'appliquer un flux croisé élevé afin d'avoir un grand rapport flux croisé sur flux d'éluion  $V_c/V$  (de l'ordre de 6-10) pour obtenir un fractionnement correct. Il reste cependant nécessaire d'effectuer des tests préliminaires selon le type d'échantillons et de particules étudiées car il est également possible avec un rapport  $V_c/V$  de l'ordre de 6-10 d'avoir une forte diminution du taux de recouvrement (Thang et al., 2001). Le débit du flux d'éluion va avoir une influence sur le profil parabolique dans le canal et donc sur la vitesse d'éluion des particules. La forme de la parabole peut être modifiée par le débit du flux. Un faible débit va diminuer l'effet de la parabole et engendrer une moins bonne séparation (Figure II-26), alors qu'un débit fort va accentuer l'effet de la parabole, cependant il amoindrira l'effet du flux croisé (Figure II-26).

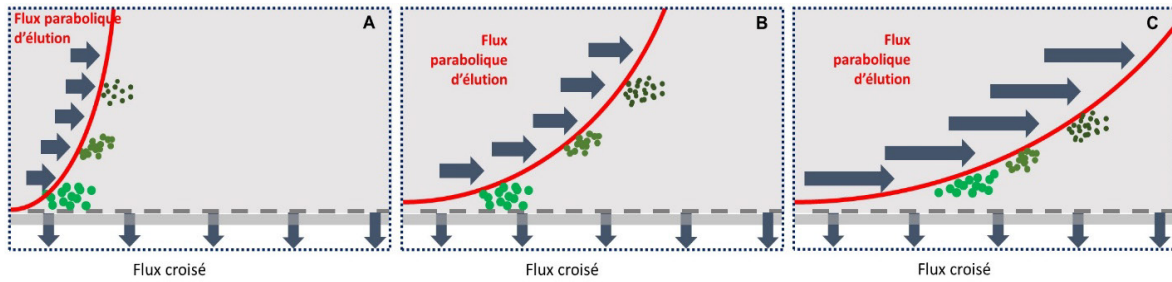


Figure II-26: Zoom schématique sur l'effet du débit du flux d'éluion sur la séparation des particules dans un canal d'AF4  
A: débit « faible », B: débit « optimale » et C: débit « fort »

Les débits des trois flux (éluion, croisé et focus) sont directement interconnectés et vont avoir des influences les uns sur les autres. Il faut ainsi prendre en considération les trois pour l'optimisation des paramètres de la méthode.

#### (d) Epaisseur du canal : espaceur

La variation de l'épaisseur du canal se fait en faisant varier la taille de l'espaceur entre 250 et 800  $\mu\text{m}$ . Cette espaceur va permettre de définir le volume disponible dans le canal pour l'éluion de la phase mobile et donc des particules. Il engendre des modifications du profil d'éluion (par élargissement ou rétrécissement) (Figure II-27). L'espaceur a donc des effets directs sur l'éluion des particules en termes de vitesse et de position dans le canal, il permet de rendre plus efficace le fractionnement selon la taille des particules étudiées mais également la gamme de taille étudiée. Par exemple de par son influence sur l'éluion, il peut permettre de travailler sur des tailles « extrêmes » (petites ou grandes) sans devoir appliquer des flux trop importants et difficilement contrôlables.

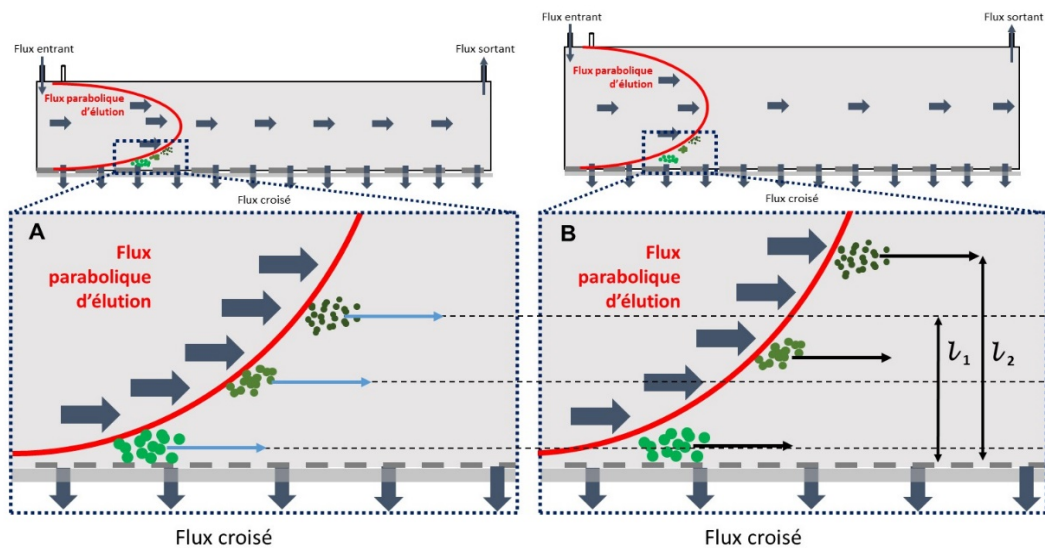


Figure II-27: Zoom schématique de l'effet de l'épaisseur de l'espaceur sur la séparation des particules dans un canal AF4 ; A : espaceur mince, B : espaceur épais ( $l_1$  et  $l_2$  représente la distance entre les particules les plus petites et la membrane)

### (e) Type et seuil de coupure de la membrane

La nature de la membrane (composition) et le seuil de coupure sont également des paramètres très importants pouvant influencer le fractionnement. Les seuils de coupure peuvent varier de 300 Da à 30 kDa, en général. Les colloïdes naturels généralement chargés négativement peuvent avoir des interactions avec la membrane (plus ou moins chargées négativement également) selon ses propriétés. Les interactions particules-membrane dépendent de la densité de charge des membranes directement reliée à la nature de la membrane. Deux principaux types de membrane sont utilisés dans un canal AF4 : les membranes en polyéther sulfone (PES) et en cellulose régénérée (RC). Les membranes PES ont une densité de charges plus faible que celle en RC, et un caractère hydrophobe plus important. Au début des études de la MOD par AF4 les membranes en cellulose ont été les plus utilisées cependant aujourd'hui les membranes en PES sont largement majoritaires notamment en raison de leur plus faible interaction avec la MOD.

Le seuil de coupure permet de définir la gamme de taille étudiée. Des seuils de coupure entre 300 Da et 10 kDa sont généralement utilisés pour l'analyse des échantillons environnementaux. Cependant l'utilisation de membranes de très faible seuil de coupure (inférieur à 1 kDa) nécessite de prendre en compte un paramètre très important : la pression engendrée dans le canal.

### (f) Phase mobile

Il est bien évidemment possible d'utiliser des phases mobiles uniquement avec de l'eau ultra-pure mais il est conseillé d'utiliser des phases mobiles tamponnées avec des sels, notamment car ces derniers peuvent permettre de stabiliser les densités de charge des membranes et de sensiblement améliorer la séparation au niveau du recouvrement et de la reproductibilité (Benincasa et al., 2002b; Schimpf et al., 2000; Schimpf and Petteys, 1997).

- **La nature du sel** influence directement le fractionnement. La nature des ions composant le sel conditionne directement le type d'interaction potentielle. Il est donc nécessaire de choisir un sel dont les ions ne sont pas à l'origine de possibles réactions de complexation ou adsorption. Il est connu qu'un cation monovalent n'a pas d'effet sur les temps de rétention (Schimpf et al., 2000; Thang et al., 2001) alors qu'un cation divalent augmentent sensiblement la distribution en taille (Benincasa et al., 2002b). Il est également possible d'avoir des effets spécifiques selon le ou les ions utilisés. Par exemple l'impact des ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  sur la séparation des acides humiques a montré une augmentation de l'adsorption sur la membrane et une condensation des acides humiques (Hartmann and Williams, 2002; Schimpf and Wahlund, 1997).

- **Le pH** influence lui aussi la séparation dans le canal. Une valeur de pH basse (inférieure à 6) de la phase mobile peut entraîner la formation d'agrégats (principalement par protonation donc diminution des charges) et ainsi un taux de recouvrement très faible (Schimpf and Wahlund, 1997). De plus, le pH a forcément un effet sur les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. Par exemple il a été démontré que le coefficient de diffusion a tendance à augmenter lorsque le pH de la phase mobile est entre 4 et 6 (Lead et al., 2000b). Il est recommandé de travailler à un pH proche des conditions environnementales des échantillons étudiés (pH 6-8). Des temps de rétention, taux de recouvrement et fractionnement optimaux ont été obtenus pour des pH de 7-8 (Schimpf et al., 2000). Une solution en termes de stabilité de pH est l'utilisation d'un tampon qui protège contre les changements de pH en raison de la dissolution du CO<sub>2</sub> dans la phase mobile (Thang et al., 2001).
- **La force ionique** de la phase mobile a une influence primordiale sur la qualité et la reproductibilité du fractionnement des particules en AF4. La force ionique permet de conditionner les charges électriques de la phase mobile, de la membrane voire de tout le système analytique. Dans la réalité du système analytique, la force ionique de la phase mobile va avoir tendance à conditionner l'épaisseur de la double couche électrique à la surface de la membrane, et donc à réguler les forces de répulsion capitales entre la membrane et les particules (S. Dubascoux et al., 2008; Hassellöv et al., 2007). De ce fait lorsque la force ionique augmente, l'épaisseur de la double couche électrique de la membrane diminue et les forces de répulsion diminuent donc également (Hassellöv et al., 2007; Neubauer et al., 2011). Cependant une force ionique trop élevée peut faciliter le passage à travers la membrane des particules associées à des phénomènes de sorption. Au contraire une force ionique trop faible peut conduire à une augmentation de la double couche électrique de la membrane et donc à des forces de répulsion entre la membrane et les particules très élevées, conduisant à un fractionnement non représentatif avec des temps de rétention très faibles (Schimpf et al., 2000). Ce fonctionnement généré par un champ de force de répulsion trop fort empêche les particules de se positionner dans le canal selon leur gradient de diffusion au contact de la membrane. Ainsi le fractionnement en mode normal n'est plus effectif (Gigault et al., 2013; Hassellöv et al., 2007; Neubauer et al., 2011).

De très nombreux paramètres peuvent donc influencer le fractionnement par AF4. Selon le type de matériel étudié, une phase d'optimisation et de réglage est nécessaire afin de définir la meilleure méthode d'analyse en fonction des paramètres déjà étudiés et utilisés dans la littérature pour le même type d'échantillon.

## vi Les détecteurs couplés en AF4

Cette partie présente les différents détecteurs utilisés pour l'étude de la matière organique dissoute et colloïdale par AF4 (UV-visible, MALLS, fluorimètre).

### (a) Détecteur UV-visible

Le détecteur UV-visible est une technique très largement utilisée depuis de très nombreuses années, notamment en chromatographie liquide. Elle permet la détection et la quantification de composés très variés absorbant dans la gamme des UV-visible (200-800 nm). Son principe repose sur un faisceau d'une longueur d'onde variable traversant une cuve (ou cellule) contenant l'échantillon (Figure II-28) ; cette cuve (ou cellule) est faite de façon à ne pas perturber l'analyse de l'échantillon (faisceaux parasites ou bulles d'air).

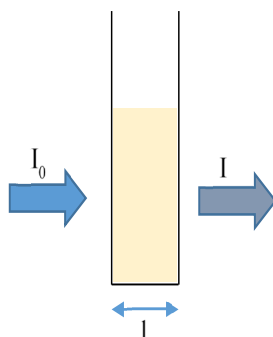


Figure II-28: Principe de l'absorption UV avec une cuve

La loi de Beer-Lambert (Équation II-13) conditionne l'absorption qui dépend principalement du coefficient d'extinction  $\epsilon$ . Ce coefficient varie en fonction de la longueur d'onde et du type de molécule (composition) :

#### Équation II-13

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon Cl$$

Avec :

- $A$  : absorbance
- $I_0$  : intensité de la lumière incidente
- $I$  : intensité de la lumière transmise
- $\epsilon$  : coefficient d'extinction ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
- $C$  : concentration de l'espèce ( $mol \cdot L^{-1}$ )
- $l$  : longueur de la cellule (cm)



Le détecteur UV-visible est le plus communément utilisé en AF4 notamment pour les applications environnementales (Gimbert et al., 2003; Hassellöv et al., 2007). Cependant il est possible de voir en l'absorbance UV-visible un inconvénient important car les colloïdes en suspension absorbent, diffusent et/ou réfléchissent la lumière donc la turbidité d'une solution peut grandement influencer le signal et ainsi modifier ou altérer l'interprétation des données. Il est donc nécessaire de travailler dans les bonnes conditions de concentration et tenir compte des différents paramètres : longueur d'onde utilisée, longueur de cuve ou cellule, type de molécules donc chromophores étudiés.

Dans le cas de l'étude de la matière organique par AF4 en utilisant un détecteur UV-visible, l'absorption de la lumière par les groupes fonctionnels aromatiques et phénoliques est plus grande que pour les autres composés (organiques ou inorganiques) (Weishaar et al., 2003). L'étude de la MOD a la particularité de dépendre de la taille des colloïdes et bien sûr de leur composition en chromophores. De plus il a été démontré que l'absorbance à 280 nm avait tendance à augmenter avec la masse molaire apparente de la MO (Chin et al., 1994) et la longueur d'onde d'absorbance maximale a été trouvée pour augmenter avec la masse molaire apparente des substances humiques (O'Loughlin and Chin, 2001). Zhou et al. (2000) recommandent une longueur d'onde de 254 nm pour suivre l'évolution de la distribution en taille pour la MO.

#### (b) Détecteur à diffusion de lumière multi-angles (MALLS)

Le détecteur à diffusion de lumière multi angle permet la détermination des masses molaires et des tailles (métriques) de particules ou colloïdes. Depuis sa création ses applications sont nombreuses, notamment en physique, chimie, biochimie et recherche pharmaceutique. Son principe est basé sur le fait que les objets (colloïdes ou nanoparticules) présents devant une lumière incidente (laser) modifient la diffusion de la lumière.

Ce phénomène peut prendre deux formes bien distinctes, isotrope (diffusion uniforme dans l'espace, ou diffusion de Rayleigh) si l'objet est petit, ou bien anisotrope pour des objets de grandes tailles. La théorie de la diffusion de la lumière est très complexe et a été de très nombreuses fois décrites dans la littérature (Berne and Pecora, 1976; Brown, 1993; Hulst and van de Hulst, 1957; Zimm, 1948a, 1948b). A partir de ces études, une équation fondamentale (Équation II-14) a pu être définie pour mettre en relation l'intensité de la diffusion de lumière avec des particules ayant une taille inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente (Wyatt, 1993). La répartition de la lumière dépend donc de la taille de l'objet considéré alors que son intensité est directement liée à sa masse.

Équation II-14

$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 c$$

Avec :

- c* : concentration ( $g.mL^{-1}$ )
- M<sub>w</sub>* : masse molaire moyenne ( $g.mol^{-1}$ )
- A<sub>2</sub>* : coefficient viral second ( $mol.mL.g^{-2}$ ) (négligeable en AF4 en raison de la forte dilution des échantillons)
- Θ* : angle entre la lumière incidente et la diffusion
- R<sub>θ</sub>* : excès de diffusion de lumière ( $cm^{-1}$ )
- P(Θ)* : fonction (facteur de forme) dépendant de l'angle *Θ*
- K* : paramètre physique constant lors d'une analyse ( $L^2.mol^{-1}.m^{-4}$ )

Le facteur de forme *P(θ)* (ou bien fonction de diffusion) qui décrit la variation de l'intensité diffusée en fonction de l'angle, est exprimé de différentes façons selon des formalismes mathématiques associés à un type d'objet (taille et forme). Dans le cadre de l'étude de particules naturelles par AF4 couplé avec le MALLS il a été démontré que l'extrapolation mathématique par le mode Zimm est la plus juste (Kammer et al., 2005).

Le MALLS est donc une technique largement répandue aujourd'hui en couplage avec l'AF4. Il présente l'avantage d'une part d'obtenir une information sur la taille et la masse des colloïdes et d'autre part de contrôler la qualité du fractionnement. Dans le cadre de ces travaux de thèse, le MALLS a permis de contrôler la taille des différents étalons utilisés pour réaliser les courbes de calibration et ainsi vérifier que les conditions analytiques (phase mobile, flux, etc.) ou bien la conservation des étalons n'avaient pas modifié ou altéré leurs masses moléculaires. Le MALLS n'a donc été utilisé dans cette étude que comme contrôle qualité des étalons.

### vii Critères pour la validation du fractionnement en AF4

L'étape de validation est importante dans le but de s'assurer de la bonne efficacité du fractionnement des échantillons, en prenant en compte l'hétérogénéité en termes de taille et de type de composé, sous des conditions analytiques bien spécifiques. Différents critères qualitatifs et quantitatifs peuvent être utilisés.

#### (a) Taux de recouvrement R

Ce critère permet d'estimer la part de l'échantillon qui est récupéré (analysé) après le fractionnement dans les conditions d'analyses. Il permet d'appréhender la représentativité des résultats obtenus par rapport à l'échantillon global (Équation II-15). Il est toujours inférieur à 100 % en raison des interactions/agrégations avec la membrane et des pertes possibles à travers la membrane de

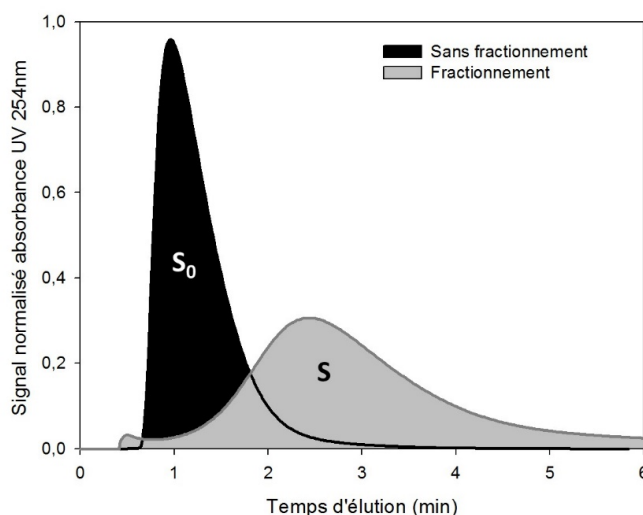
composés de très faible poids moléculaire dans les échantillons environnementaux. Cet indicateur est largement utilisé pour évaluer l'efficacité du fractionnement notamment en termes de représentativité (Schimpf and Petteys, 1997).

*Équation II-15*

$$R = \frac{S}{S_0} * 100 (\%)$$

Avec :  $S$  : aire du pic obtenu après le fractionnement dans les conditions d'analyse normale  
 $S_0$  : aire du pic obtenu sans aucun fractionnement

La Figure II-29 montre un exemple de fractogramme pour le calcul du taux de recouvrement avec un fractogramme (partie noire) sans fractionnement et un autre (partie grise) avec fractionnement. Selon l'étude réalisée, le signal utilisé pour intégrer le pic doit être choisi en prenant en compte les avantages et les inconvénients de chacun tout en sachant que dans la mesure du possible le détecteur doit le moins possible être dépendant de la taille ou bien du type des particules mais uniquement de sa concentration. Le détecteur UV/Visible est largement utilisé (Figure II-29).



*Figure II-29: Fractogramme de séparation AF4 avec et sans le fractionnement pour le calcul du taux de recouvrement*

### (b) Forme des pics

Ce critère qualitatif repose sur l'observation de la forme et de la résolution des pics. Il donne des informations sur la qualité du fractionnement et peut permettre de tirer des conclusions sur les paramètres à modifier pour améliorer la séparation. Dans le cadre de séparation par AF4, la forme des pics doit être la plus proche possible d'une gaussienne, prouvant une bonne séparation. Alors que de possibles interactions avec le système analytique peuvent entraîner des pics larges ou bien dédoublés et un fractionnement insuffisant des composés étudiés peuvent amener à des pics très étroits pour un échantillon possédant une distribution polydisperse.

### (c) Répétabilité

Ce critère est utilisé par un nombre  $n$  de réplicats d'une même analyse (échantillon et conditions). Il permet par le calcul de la moyenne et de l'écart type pour le temps de rétention  $t_r$  obtenu ou bien le taux de recouvrement de prouver la capacité des conditions d'analyse et du système à obtenir des résultats semblables.

### (d) La linéarité de la séparation

Au cours d'une analyse par AF4 en mode normal, le fractionnement est déterminé par le coefficient de diffusion des particules et donc par leur taille (rayon hydrodynamique). L'Équation II-9 montre les liens entre le rayon hydrodynamique  $R_h$  et le temps de rétention  $t_r$  (Schimpf et al., 2000). Ainsi quand le flux croisé est constant et que le temps de rétention est significativement supérieur à une minute, l'équation peut être simplifiée pour obtenir une relation directe entre  $R_h$  et  $t_r$  (Équation II-16).

Équation II-16

$$R_h = A \cdot t_r$$

Avec :  $A$  : paramètre constant

Ainsi la linéarité de cette équation est vérifiée au cours du fractionnement à l'aide d'une courbe de calibration. L'utilisation d'étalons de tailles ou masses moléculaires connues permet donc de tracer une courbe de calibration de la masse moléculaire en fonction du temps de rétention (Figure II-30). Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) de cette courbe renseigne sur la linéarité et donc sur la qualité de la séparation. Ainsi l'objectif est d'obtenir un coefficient de détermination le plus proche possible de 1.

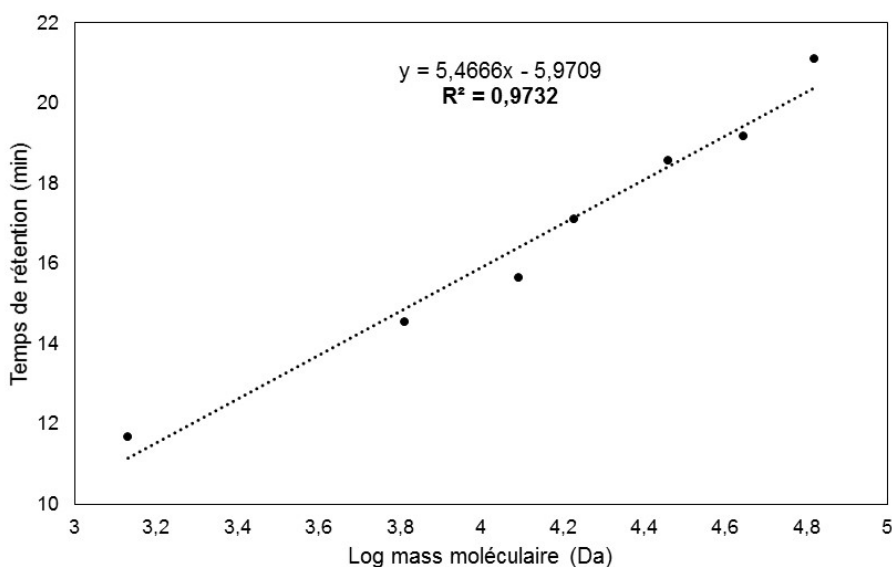


Figure II-30: Exemple de courbe de calibration à partir d'étalons de masses moléculaires comprises entre 1.35kDa et 66kDa afin de vérifier la linéarité de la séparation

(e) Détermination de la masse moléculaire moyenne

A l'aide d'une droite de calibration (linéaire ;  $R^2 \approx 1$ ) obtenue avec des étalons choisis pour couvrir la gamme de tailles des constituants de la MOD (Figure II-30), l'utilisation de l'équation de la courbe permet de déterminer une masse moléculaire moyenne apparente pour un échantillon inconnu. L'équation de la courbe est obtenue à partir de la droite de calibration du temps de rétention en fonction du logarithme de la masse moléculaire (Équation II-17).

Équation II-17

$$t_r = a \log (MM) + b$$

Avec :  $t_r$  : temps de rétention  
 $MM$  : masse moléculaire  
 $a$  et  $b$  : paramètres constants

La modification de l'Équation II-17 permet pour un échantillon inconnu de déterminer sa masse moléculaire à partir de son temps de rétention à l'aide de l'Équation II-18.

Équation II-18

$$MM = 10^{\left(\frac{t_r - b}{a}\right)}$$

La Figure II-31 détaille les principales étapes de séparation par AF4 d'un échantillon d'eau naturelle.

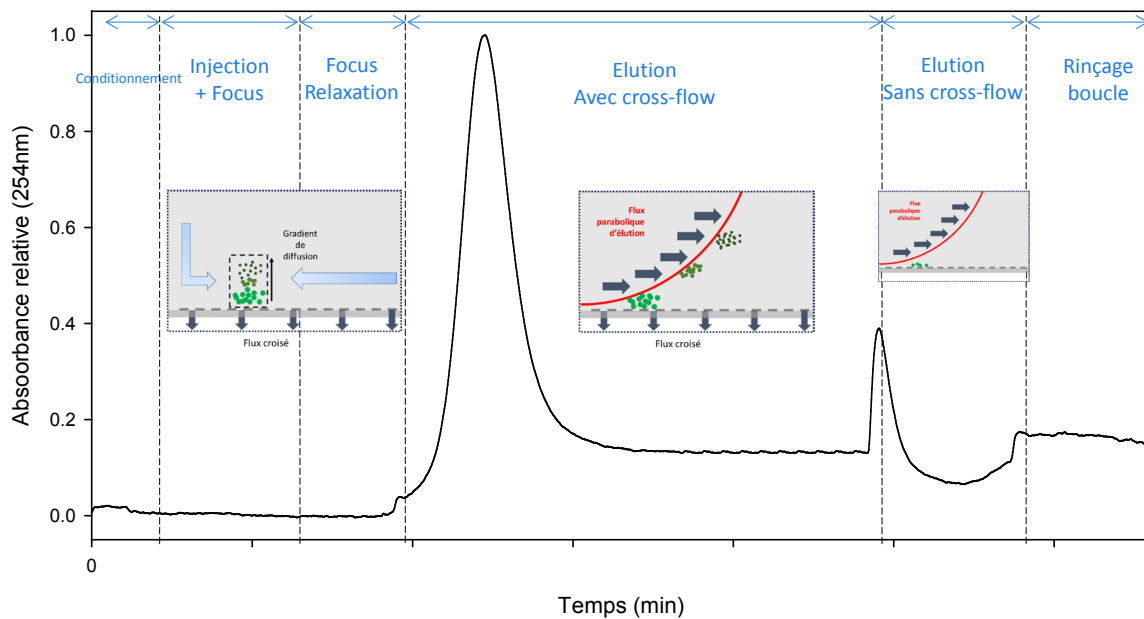


Figure II-31: Schéma récapitulatif des étapes de fractionnement par AF4 de la MOD

## *b Présentation des systèmes AF4 utilisés dans ce travail*

### *i AF4 Wyatt Technology ®*

Le système de fractionnement par couplage flux/force Wyatt ® est un système Eclipse 3 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany) couplé à une chaîne HPLC (Agilent HP 1200 series). Un dégazeur (1200Series, G1322A) en ligne élimine les potentielles bulles de la phase mobile avant son arrivée dans la pompe isocratique (1200Series, G1310A). Cette dernière contrôle les flux alimentant le système Eclipse en phase mobile. Un filtre en ligne de 0,1 µm en Polyfluorure de vinylidène (PVDF) est placé entre la pompe et le système AF4 de telle sorte que des impuretés ne puissent pas arriver dans le canal. Le canal de fractionnement AF4 est un canal court Wyatt (L : 18,5 cm ; l : 5,5 cm ; h : 5 cm) équipé d'un espaceur en Mylar Wyatt de 490 µm. Les membranes utilisées sont en polyéther sulfone (PES, Pall Omega® ou Alting®), le seuil de coupure utilisé est de 1kDa et elles sont soit pré-découpées pour les membranes Pall-Oméga® soit découpées en laboratoire avant installation pour les membranes Alting®. Deux boucles d'injection ont été utilisées 100 µL pour les solutions étalons dans le cadre de l'optimisation et 1 mL pour les solutions étalons et les échantillons naturels.

Ce système est équipé en ligne d'un détecteur par spectrophotométrie UV-visible (HP 1200 Series G1314B Agilent) et d'un détecteur de diffusion de lumière multi-angles (MALLS : Multi Angle Laser Light Scattering ; 3 angles – MiniDAWN TREOS, Wyatt Technology, Dernbach, Germany).

### *ii AF4 Postnova ®*

Le système qui a été utilisé lors d'une mobilité internationale à l'Université de Trent (Ontario, Canada) est un système de fractionnement AF2000 Focus (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) équipé de deux pompes HPLC PN1130 pour contrôler le flux axial (ou flux principal) et le flux du focus, une pompe seringue PN1160 pour le contrôle du flux croisé et un dégazeur PN1175 pour éliminer les bulles d'air de la phase mobile avant l'arrivée dans les pompes. Le canal utilisé est un canal Postnova (L : 33,5 cm ; l : 6 cm ; h : 4 cm) équipé d'un espaceur de 500 µm. Les membranes utilisées sont en polyéther sulfone (PES) et d'un seuil de coupure de 300 Da (Postnova Analytics). Pour chaque échantillon ou blanc, 2mL sont injectés dans la boucle d'injection Rheodyne de 0,9 mL afin de la conditionner et d'éviter au maximum l'effet mémoire des échantillons précédents.

Ce système est équipé d'un détecteur couplé en ligne à barrette de diode (DAD) Shimadzu SPD-M20A pour une longueur d'onde de 254 nm.

### 3 Techniques spectroscopiques

#### *a Spectroscopie d'absorption UV-visible*

##### *i Principe de l'absorption UV-visible*

La MOD possède différents groupements fonctionnels appelés chromophores. Par absorption de photons de radiations UV et visible (souvent entre 250 et 500 nm) les molécules de MOD vont être excitées à des niveaux d'énergie électronique plus élevés. Dans le cas de la MOD les énergies observées sont d'environ 250 à 500 kJ.mol<sup>-1</sup>, typiques des transitions électroniques  $\pi \Rightarrow \pi^*$  et  $n \Rightarrow \pi^*$  (les autres transitions ont des niveaux d'énergie trop élevées pour être observées à ces longueurs d'onde) (Figure II-32). Mais il faut tenir compte du fait que ces transitions électroniques ne sont possibles que pour des échantillons contenant des molécules pourvues d'électrons  $\pi$  et/ou d'hétéroatomes avec des électrons non liants.

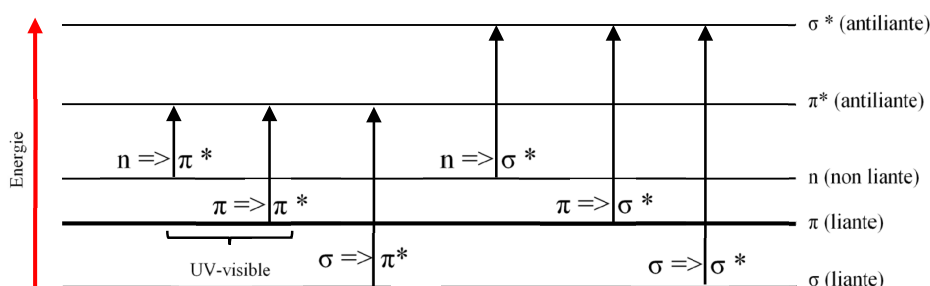


Figure II-32: Transitions électroniques entre orbitales moléculaires

Selon la longueur d'onde d'absorbance, il est, de façon théorique, possible de déterminer les chromophores présents dans l'échantillon. Mais la longueur d'onde et la valeur d'absorbance peuvent être modifiées par les molécules avoisinantes des atomes ayant des excitations électroniques.

Les spectres d'absorption UV-visible vont pouvoir mettre en évidence le caractère aromatique des échantillons. De façon générale, les molécules aromatiques (polycycliques, phénoliques et benzoïques) absorbent entre 250 et 280 nm et certains auteurs utilisent préférentiellement les absorbances entre 270 et 280 nm pour l'étude de l'aromaticité (Perdue and Ritchie, 2003; Thomsen et al., 2002) ou bien uniquement à 254 nm (Akkanen et al., 2005; Borisover et al., 2006). Etant donné que l'absorbance dépend directement de la concentration de l'échantillon, il est donc impossible de comparer l'absorbance d'échantillons entre eux. En effet d'après la loi de Beer-Lambert (Équation II-13), la valeur d'absorbance est directement liée à la concentration.

Le spectre d'absorption de la MOD naturelle est continu, il n'apparaît pas de pic distinct en raison du mélange complexe de nombreux chromophores. Il décroît de façon exponentielle avec l'augmentation

de la longueur d'onde (Bricaud et al., 1981). L'absorbance pour un échantillon est calculée à l'aide de l'Équation II-19.

*Équation II-19*

$$a_{DOM} = 2,303 * A(\lambda) / l$$

Avec :  $A(\lambda)$  : absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$

$l$  : longueur du chemin optique (cm)

La linéarité de la transformation logarithmique du coefficient d'absorption de la MOD le long d'une gamme de longueurs d'ondes a longtemps été utilisée pour calculer la pente spectrale S (Bricaud et al., 1981). Cependant, des régressions non-linéaires permettent d'obtenir de meilleures estimations de S en se concentrant sur des régions spectrales spécifiques, dans le domaine UV où l'absorption de la MOD est la plus élevée (Stedmon et al., 2000). De plus, la valeur de la pente spectrale S varie en fonction de la gamme de longueurs d'onde utilisée pour la régression (Blough and Del Vecchio, 2002). Ainsi pour l'étude de la MOD, les pentes spectrales entre 275-295 nm et entre 350-400 nm sont majoritairement utilisées ainsi que le rapport SR de ces pentes spectrales. Ce dernier permet d'estimer la variation du poids moléculaire de la MOD. Quand SR augmente le poids moléculaire diminue (Helms et al., 2008).

De plus, un indice est communément utilisé afin de caractériser l'aromaticité : le SUVA<sub>254</sub> (Équation II-20).

*Équation II-20*

$$SUVA = \frac{a_{254}}{[COD]} * 100$$

Avec :  $a_{254}$  : Absorbance à 254 nm

$[COD]$  : concentration en carbone organique en mg.L<sup>-1</sup>

L'ensemble des indices et paramètres utilisés à partir des mesures d'absorbance pour l'étude de la MOD naturelle sont présentés dans le Tableau II-6.

## ii Présentation du spectrophotomètre

Le spectrophotomètre UV-visible utilisé est un Jasco V-560 équipé d'un tube à décharge au deutérium pour les longueurs d'onde allant de 190 à 350 nm et d'une lampe à incandescence à filament de tungstène pour les longueurs d'onde de 330 à 900 nm, d'un double monochromateur pour la sélection des longueurs d'onde et d'un photomultiplicateur comme détecteur, pour transformer l'intensité lumineuse reçue en un signal électronique.



Tout d'abord, l'enregistrement de la ligne de base a été effectué en utilisant une cellule en quartz, de trajet optique égal à 1 cm, remplie d'eau ultra-pure (Milli-Q, Millipore) utilisée comme solvant de référence. L'acquisition est faite en mode simple faisceau c'est-à-dire que le signal de référence (cuve + eau ultra-pure) se fait avant l'échantillon puis il est soustrait manuellement afin d'utiliser exactement la même cuve pour les deux acquisitions et ainsi limiter les erreurs. Le spectre d'absorbance obtenu pour le blanc a ensuite été soustrait aux spectres d'absorbance de chacun des échantillons afin d'obtenir l'absorbance réelle de chacune des solutions.

## *b Spectroscopie de fluorescence*

### *i Principe de la fluorescence*

Chaque molécule possède des niveaux d'énergie associés à des états de rotation, de vibration ou de configuration électronique. Le diagramme de Perrin-Jablonski en Figure II-33 montre les niveaux énergétiques d'une molécule. L'axe horizontal représente l'énergie de l'état électronique fondamental de la molécule, qui est un état singulet noté  $S_0$ . Les lignes supérieures représentent l'énergie des états électroniques excités : les deux colonnes de gauche montrent le premier et les seconds états électroniques singulet  $S_1$  et  $S_2$  ; la colonne de droite correspond à l'énergie du premier état électronique triplet  $T_1$ . L'énergie du premier état excité est inférieure à celle des états singulets correspondants.

L'état singulet désigne l'état moléculaire au cours duquel tous les électrons sont appariés. Mais lorsqu'une paire d'électrons d'une molécule est excitée à un niveau d'énergie supérieur, il y a formation d'un état excité singulet ou triplé. Pour l'état excité singulet, le spin de l'électron excité reste apparié avec l'électron qui se trouve à l'état fondamental ; pour l'état excité triplet, les spins des deux électrons sont parallèles (non appariés) (Skoog et al., 2003).

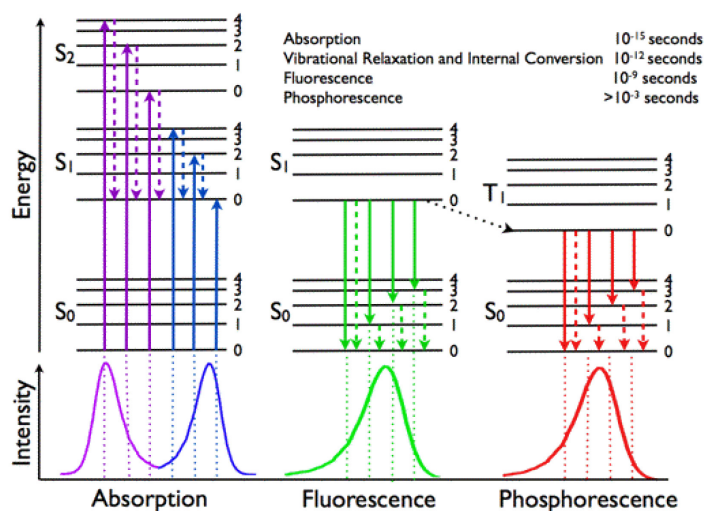


Figure II-33: Diagramme de Perrin-Jablonski (d'après Visser et Rolinski, 2014)

A chaque état électronique est associé un niveau vibrationnel ( $v= 0, 1, 2...$ ) pour lequel correspond un niveau d'énergie rotationnelle de plus faible énergie. Dans son état « normal » une molécule se trouve généralement à son plus bas niveau d'énergie, donc le niveau vibrationnel  $V= 0$  de l'état singulet  $S_0$ . Lors de l'absorption d'un photon (très rapide,  $10^{-15}$  s) la molécule va passer à l'un des états excités vibrationnels de  $S_1, S_2...$  Or il est impossible pour la molécule de rester dans un état électronique excité de niveau vibrationnel élevé, on parle d'état transitoire. Pour retourner à son état fondamental, la molécule a recours à plusieurs processus de désexcitation :

- La relaxation vibrationnelle : passage d'un état vibrationnel élevé au niveau vibrationnel le plus bas d'un état électronique donné. Ce mécanisme est efficace car la durée moyenne d'un état vibrationnel excité est de  $10^{-12}$  s.
- La conversion interne : passage à un état électronique inférieur sans émettre de rayonnement, cependant la durée moyenne d'un état vibrationnel excité est de  $10^{-11}$  s à  $10^{-9}$  s.

Lorsqu'une molécule est excitée, la conversion interne et la relaxation vibrationnelle vont rapidement la ramener au niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité singulet ( $S_1, V= 0$ ). Cet état possède une durée de vie de  $10^{-10}$  à  $10^{-7}$  s, ensuite le retour à l'état fondamental peut se faire de trois manières : sans émission de photons (retour non radiatif), avec émission de photons (phénomène de fluorescence) ou par passage intersystème (également appelé croisement intersystème) vers le premier état excité triplet  $T_1$  suivi éventuellement d'une émission de photons (phénomène de phosphorescence).

La fluorescence apparaît donc lors de l'émission de photons depuis l'état vibrationnel le plus bas du premier état singulet ( $S_1, V= 0$ ) vers les différents niveaux vibrationnels de l'état électronique fondamental  $S_0$ .

#### ii Influence sur l'émission de fluorescence :

L'efficacité de la désexcitation par fluorescence est dépendante de la rapidité de l'émission de cette fluorescence, en comparaison avec celle des deux autres phénomènes que sont le retour radiatif et le croisement inter-système, et également de la nature de la structure de la molécule en question, de son environnement et de la température.

Un des éléments importants de la fluorescence est le système  $\pi$  étendu. Les molécules contenant des groupements fonctionnels aromatiques ont la fluorescence la plus intense. Pour les molécules contenant des groupements fonctionnels de type aliphatiques et alicycliques ou encore des doubles liaisons conjuguées il peut y avoir de la fluorescence mais elle est moins intense que dans le cas des structures aromatiques (Skoog et al., 2003). Lors de la présence de substituants au sein de noyaux aromatiques, la fluorescence va être modifiée, par exemple les groupements accepteurs

d'électrons vont engendrer une diminution de l'intensité de la fluorescence alors qu'à l'inverse les groupements donneurs (comme -OH, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>) vont l'augmenter (Senesi, 1990).

La géométrie de la molécule influence également l'efficacité de la fluorescence, il a été démontré que les molécules possédant une structure rigide, pour lesquelles la possibilité de désactivation non radiative est plus faible étant donné qu'elles auront moins tendance à interagir avec le solvant ou d'autres particules, vont avoir une intensité de fluorescence plus intense.

La température et le choix du solvant sont des paramètres importants, lorsque la température augmente l'efficacité de la désactivation par fluorescence de la plupart des molécules va diminuer. Une réduction de la viscosité du solvant va avoir le même effet (Skoog et al., 2003).

Le pH joue aussi un rôle important car il va influencer la longueur d'onde et l'intensité d'émission de la fluorescence des composés aromatiques avec des groupements acides ou basiques (Senesi, 1990).

La diffusion de la lumière est un paramètre à prendre en compte car elle peut engendrer des perturbations des spectres de fluorescence. Il existe trois types de diffusion : diffusion Rayleigh (élastique = énergie de photons non modifiée), diffusion Tyndall (élastique) et diffusion Raman (inélastique).

### iii Intensité de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$  (rapport entre nombre de photons émis et absorbés) permet de caractériser l'efficacité de la désactivation de la fluorescence.

L'intensité de fluorescence  $I_F$  est liée à l'intensité absorbée  $I_A$  et au rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$  par l'équation :  $I_F = K * \Phi_F * I_A$  où K est le facteur d'efficacité de l'instrument.

Après une succession d'équations, nous obtenons l'expression suivante (Équation II-21) de l'intensité de fluorescence :

*Équation II-21*

$$I_F = 2,3 * I_0 * \epsilon_{\lambda} * c * l * K * \Phi_F$$

Avec :  $I_0$  : intensité incidente  
 $\epsilon_{\lambda}$  : coefficient d'absorption molaire ( $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ )  
 $C$  : concentration du soluté ( $mol.L^{-1}$ )  
 $l$  : chemin optique (cm)

### iv Types de spectres de fluorescence

Deux principaux types de spectres sont obtenus par spectrofluorimétrie :

- Spectre d'émission : obtenus en mesurant l'intensité de fluorescence en fixant une longueur d'onde d'excitation tout en faisant varier la longueur d'onde d'émission
- Spectre d'excitation : obtenus en mesurant l'intensité de fluorescence en fixant une longueur d'onde d'émission tout en faisant varier la longueur d'onde d'excitation

Afin de simplifier l'interprétation des spectres, Lloyd en 1971 introduit la spectroscopie de fluorescence synchrone. L'objectif de cette méthode est de mesurer l'intensité de fluorescence tout en faisant varier de façon simultanée les longueurs d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}$  et d'émission  $\lambda_{em}$  tout en conservant un décalage constant entre les deux. Cette technique synchrone permet d'obtenir de meilleures informations sur les fluorophores présents dans une solution complexe.

Aujourd'hui la spectroscopie de fluorescence tridimensionnelle est très largement utilisée car elle permet de tracer, à partir des matrices d'excitation-émission de fluorescence (EEM), les spectres d'émission, d'excitation ainsi que les spectres synchrones et donc de voir l'ensemble du domaine spectral pour déterminer les différents fluorophores.

L'appareil utilisé pour l'acquisition des matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence est un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-22 HORIBA Jobin Yvon composé d'une lampe à arc Xénon de 450 Watts, avec une émission de rayonnement polychromatique continu dans l'UV et le visible entre 250 et 800 nm, et de doubles monochromateurs à l'excitation et à l'émission. Le compartiment échantillon est thermostaté à 20°C et le photomultiplicateur refroidi par effet Peltier.

### *c Acquisition des spectres*

#### *i Correction des spectres EEM*

En raison des phénomènes de diffusion de lumière Rayleigh et Raman, le spectre du solvant seul (eau ultra-pure, Milli-Q, Millipore) est soustrait au spectre de fluorescence de l'échantillon acquis dans les mêmes conditions afin d'éliminer les bandes dues aux diffusions.

Afin de s'affranchir des déviations dues à l'appareillage des corrections instrumentales, comme la correction à l'émission, ont été systématiquement appliquées (Huguet et al., 2009). D'autre part, l'utilisation d'une photodiode placée dans le compartiment échantillon permet d'obtenir un spectre corrigé des variations de la lampe en effectuant le rapport du signal photomultiplicateur et du signal de référence (mode S/R ; Sample/Reference).

## ii Protocole pour l'acquisition d'un spectre EEM

### (a) Mesure de l'absorbance

L'acquisition des spectres d'absorbance est réalisée entre 210 et 700 nm. Une première analyse sur un échantillon d'eau ultra-pure est réalisée pour obtenir un blanc, puis l'absorbance des échantillons est mesurée. Le blanc est ensuite soustrait aux spectres des échantillons. Après cette soustraction, on vérifie la valeur d'absorbance maximale de l'échantillon. Dans le cas où cette valeur est supérieure à 0,1, l'échantillon doit être dilué pour être analysé par spectrofluorimétrie afin d'éviter les effets de filtre interne et pour que l'intensité de fluorescence soit proportionnelle à la concentration en fluorophores

### (b) Spectres EEM

Les spectres 3D ou EEM (Figure II-34) sont obtenus par l'acquisition successive de 17 spectres d'émission (260-700 nm) pour des longueurs d'onde d'excitation prises tous les 10 nm entre 250 et 410 nm (Parlanti et al., 2000). La soustraction du spectre 3D d'un blanc d'eau ultra-pure (Milli-Q, Millipore) réalisé dans les mêmes conditions permet d'obtenir le spectre 3D de l'échantillon. Ce dernier est corrigé si nécessaire du facteur de dilution appliqué en raison de fortes absorbances.

Les matrices ont par la suite été traitées par Excel et SigmaPlot 10.0.

### *a Spectroscopie de fluorescence et matière organique*

La matière organique et notamment les substances humiques, ont été analysés par fluorescence depuis les années 1970 (Lévesque, 1972). Le développement de la fluorescence 3D, qui regroupe l'ensemble des données spectrales par rapport aux spectres 2D, a permis de réels progrès (Coble, 1996). A partir des empreintes enregistrées, il est possible de déterminer l'origine allochtone, autochtone et le degré de maturation de la matière organique étudiée. Dans de bonnes conditions opératoires, des données semi-quantitatives peuvent également être obtenues (Alberts and Takacs, 2004; Coble, 1996; Mobed et al., 1996; Parlanti et al., 2000; Senesi, 1990; Zsolnay et al., 1999).

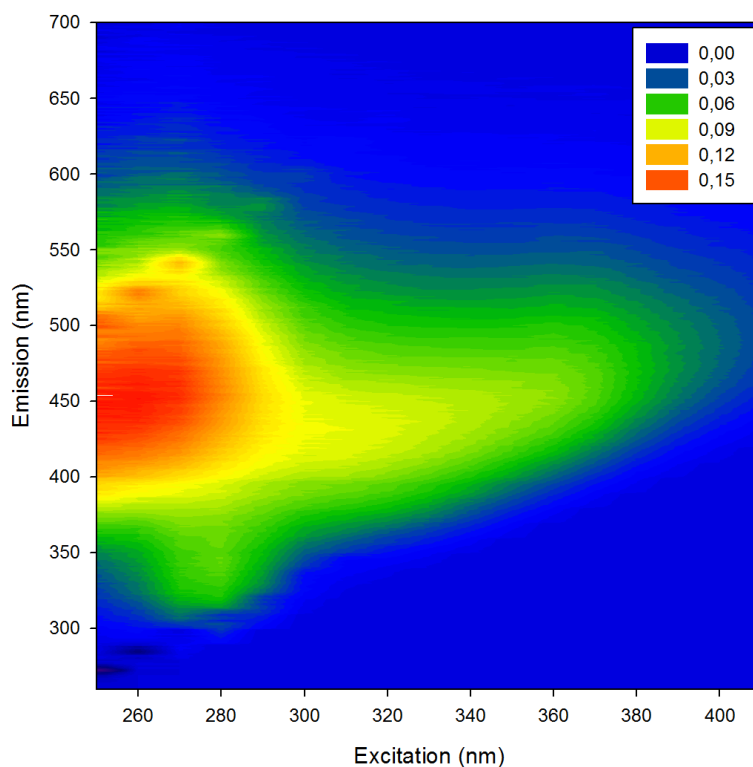


Figure II-34: Exemple d'un spectre EEM de MOD

Les spectres d'excitation des substances humiques donnent des bandes très larges entre 300 et 700 nm. Une classification assez subjective a conduit à une localisation des pics principaux, des pics secondaires et des épaulements (Senesi et al., 1991). Les acides humiques de sol présentent un maximum d'émission principal situé autour de 500-550 nm et les acides fulviques un maximum principal vers 450 nm. Le résultat étonnant est que l'on retrouve généralement les mêmes caractéristiques d'émission quel que soit l'origine de la substance humique. Ceci suggère fortement que l'émission est due aux mêmes types de constituants. D'autres classifications ont été proposées pour les matières organiques du milieu aquatique par Coble et al.(1996) et Parlanti et al.(2000) notamment. La nomenclature des fluorophores présents dans les écosystèmes aquatiques est indiquée dans le Tableau II-6 et un exemple de spectre EEM pour la MOD est présenté en Figure II-34.

Jusqu'à présent, la nature des constituants émissifs reste inconnue. Quelques structures chimiques ont été proposées sur la base d'analogie entre la fluorescence de composés modèles et celle des substances humiques : la 3 et la 4 hydroxycoumarine et l'uracile, pour le pic  $\alpha'$ , l'adénine, l'acide 2-aminobenzoïque, la 7-hydroxycoumarine, le 5-phosphate pyridoxal et l'acide salicylique pour le pic  $\alpha$  (Alberts and Takacs, 2004).

L'ensemble des indices et paramètres utilisés à partir des mesures de fluorescence pour l'étude de la MOD naturelle est présenté Tableau II-6.

## *b PARAFAC*

Dans les EEMs de fluorescence de la MOD, les différents fluorophores, contribuant à la fluorescence globale de la MOD, donnent des émissions de fluorescence qui se superposent et ont une influence mutuelle sur leur profil et donc sur leur maximum de fluorescence. En 1997, Bro développe une méthode de traitement numérique pour séparer les différentes contributions spectrales dans un même spectre, la méthode PARAFAC (PARAllel FACTors analysis). En 2003, Stedmon et al. (2003) ont appliqué PARAFAC aux EEMs de MOD naturelle dans le but de mieux suivre la production et la dégradation de la MOD dans l'environnement. PARAFAC est donc un outil de traitement statistique pour la décomposition de spectres EEM à partir d'un algorithme d'alternance des moindres carrés pour minimiser la somme des carrés des résidus dans un modèle trilinéaire.

Le principe de la méthode PARAFAC est basé sur une méthode d'analyse de données par un modèle trilinéaire qui utilise un jeu de données, noté  $X$ , constitué d'un ensemble de spectres EEM. Chaque élément  $x_{i,j,k}$  de  $X$  correspond à l'intensité de fluorescence du  $i$ -ième échantillon obtenue pour la  $j$ -ième longueur d'onde d'émission et pour la  $k$ -ième longueur d'onde d'excitation. Dans ce modèle, le jeu de données  $X$  est fonction de trois matrices  $A$ ,  $B$  et  $C$ , appelées modes. Les dimensions respectives sont  $I \times N$ ,  $J \times N$  et  $K \times N$  avec  $N$  le nombre estimé de fluorophores,  $I$  le nombre d'échantillons,  $J$  et  $K$  le nombre de longueurs d'onde d'émission et d'excitation mesurées. Ainsi dans le cas d'un jeu de données EEM,  $X$  ne suit pas exactement un modèle trilinéaire. Il y a un écart résiduel  $\varepsilon_{i,j,k}$  entre les intensités de fluorescence mesurée  $x_{i,j,k}$  et le modèle trilinéaire ce qui donne l'Équation II-22.

*Équation II-22*

$$X_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + \varepsilon_{ijk}$$

Avec :

$X_{ijk}$  : intensité de fluorescence du  $i$ -ième échantillon obtenue pour la  $j$ -ième longueur d'onde d'émission et pour la  $k$ -ième longueur d'onde d'excitation

$a_{if}$  : concentration relative en composant  $f$  pour le  $i$ -ième échantillon

$b_{jf}$  : émission pour le  $f$ -ième composant

$c_{kf}$  : excitation pour le  $f$ -ième composant

$\varepsilon_{i,j,k}$  : erreur résiduelle due à ce qui n'est pas pris en compte par le modèle

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse PARAFAC a été menée à l'aide du logiciel MATLAB 7.10 (R2010a) avec la DOMfluor toolbox version 2.0 en utilisant la procédure détaillée (Stedmon and Bro, 2008). Finalement le traitement de données PARAFAC appliqué aux EEMs de MOD aquatique naturelle

permet d'extraire du jeu global de fluorescence des composants non-identifiables directement et de comparer les échantillons entre eux au travers des signaux de fluorescence complets et non plus en se basant sur les mesures de 4-5 pics grâce à leur maximum de fluorescence par « peak-picking » (Coble, 1996). Cette approche permet d'améliorer les connaissances sur la composition en fluorophores de la MOD. Dans ce travail, l'outil PARAFAC a été appliqué à l'estuaire de Seine.

#### 4 Mesure de carbone organique dissous (COD)

Les dosages du carbone organique dissous ont été réalisés à l'aide d'un appareil Shimadzu TOC V CSN, en mode NPOC (carbone organique non purgeable). Le principe de cette mesure consiste en une oxydation catalytique à haute température (680°C) du carbone organique dans des échantillons préalablement filtrés, acidifiés (HCl, 2M à pH 2) et purgés pendant 6 minutes à l'air synthétique pour éliminer le carbone inorganique. Le carbone organique dissous est ainsi transformé en CO<sub>2</sub> par l'oxydation puis mesuré par un détecteur infrarouge. Le catalyseur utilisé (Shimadzu) est à base de platine contenu dans de l'alumine. L'appareil est initialement calibré avec une solution standard de phtalate de potassium C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOK)(COOH) à différentes concentrations. En fonction de la teneur en COD des échantillons, différentes gammes étalons de standards ont été utilisées.

La teneur en COD de chaque échantillon résulte de la moyenne d'au moins trois mesures, avec un écart-type et un coefficient de variation satisfaisants (< 2%).

De plus, au cours de chaque série d'analyse d'échantillons naturels, au moins deux échantillons de référence certifiés (CRM) (Tableau II-5 ; ANALAB, Environnement Canada) sont testés afin de s'assurer de la qualité des mesures et de valider les résultats.

*Tableau II-5: Liste des échantillons référencé certifiés (CRM) utilisés*

CRM	COD (mg.L <sup>-1</sup> )
SUPER 05	1,30 ± 0,47
HAMIL 20.2	3,00 ± 0,55
ION 96.4	4,66 ± 0,63
MAURI 09	6,02 ± 0,71
KEJIM 02	7,15 ± 0,84



Tableau II-6: Récapitulatif des indices et paramètres de caractérisation définis pour l'étude de la MOD naturelle par absorbance et fluorescence

<b>Absorbance</b>				
	Nom de code	Calcul	Interprétation	Référence
<b>SUVA - absorbance spécifique dans l'ultraviolet (L mg C<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>)</b> <b>Coefficient d'absorption a254 (m<sup>-1</sup>)</b> <b>Coefficient d'absorption a350 (m<sup>-1</sup>)</b>	<b>SUVA</b>	Absorption à 254nm divisée par la concentration en COD	Absorbance par unité de Carbone en mg C.L-1. Une grande valeur indique un matériel plus aromatique; fournit une mesure d'aromaticité	Weishar et. 2003
	<b>a<sub>254</sub></b>	(Absorbance à 254nm) x 2,303 x 100	Mesure de l'aromaticité de la MOD	Green and Blough (2008)
	<b>a<sub>350</sub></b>	(Absorbance à 350nm) x 2,303 x 100	Indication sur la concentration en phénol et donc sur l'impact des apports terrigènes	Hernes and Benner 2003
<b>Pente spectrale S<sub>275-295</sub> nm (nm<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>275-295</sub></b>	Ajustement non linéaire de la fonction exponentielle du spectre d'absorption sur la gamme de longueur d'onde 275-295nm	Une grande valeur peut indiquer une petite taille moléculaire ou un faible taux d'aromaticité. Aussi utilisé pour un traceur de source terrigène de carbone organique dissoute dans les zones côtières ou océanique sous influence de rivières	Blough and Del Vecchio (2002), Helms et al. (2008), Fichot et al. (2012)
<b>Pente spectrale S<sub>350-400</sub> nm (nm<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>350-400</sub></b>	Ajustement non linéaire de la fonction exponentielle du spectre d'absorption sur la gamme de longueur d'onde 350-400nm		
<b>Sr – Rapport pentes spectrales S<sub>275-295</sub>/S<sub>350-400</sub></b>	<b>Sr</b>	Slope ratio S <sub>275-295</sub> nm divisé par Slope ratio S <sub>350-400</sub> nm	Il peut être utilisé comme un proxy de la taille moléculaire; plus il augmente plus la taille moléculaire diminue	Helms et al. (2008)
<b>Rapport de l'absorbance à 254 sur 365nm</b>	<b>a<sub>254</sub>/a<sub>365</sub></b>	Rapport de l'absorbances à 254nm sur l'absorbance à 365nm	Permet d'approximer la taille moléculaire; négativement corrélé avec la taille moléculaire	
<b>Aromaticité</b>	<b>%aromaticité</b>			
<b>Fluorescence</b>				
<b>Substances type humique</b>	<b>α ou peak C</b>	Pic maximum pour des longueurs d'onde d'excitation 350-370nm et d'émission 420-480nm	<b>Substances type humique</b>	(Coble, 1996; Parlanti et al., 2000)
<b>Substances type humique + matériel plus récent</b>	<b>α' ou peak A</b>	Pic maximum pour des longueurs d'onde d'excitation 230-260nm et d'émission 380-480nm	<b>Substances type humique + matériel plus récent</b>	(Coble, 1996; Parlanti et al., 2000)
<b>Matériel biologique matériel récent</b>	<b>β ou peak M</b>	Pic maximum pour des longueurs d'onde d'excitation 310-320nm et d'émission 360-410nm	<b>Matériel biologique matériel récent</b>	(Coble, 1996; Parlanti et al., 2000)

<b>Protéines et activités bactériennes</b>	<b><math>\gamma</math> ou peak T</b>	Pic maximum pour des longueurs d'onde d'excitation 270-280nm et d'émission 300-320nm	<b>Protéines et activités bactériennes</b>	(Coble, 1996; Parlanti et al., 2000)
<b>Rapport de pic <math>\alpha'</math> / <math>\gamma</math> ou A/T</b>	<b>A/T</b>	Rapport de l'intensité des pics $\alpha$ (ex260/em450) sur le pic $\gamma$ (ex275/em310)	Indication sur la proportion de matériel humique plus récent par rapport aux matériels protéiques	
<b>Rapport de pic <math>\alpha</math> / <math>\alpha'</math> ou C/A</b>	<b>C/A</b>	Rapport de l'intensité des pics $\alpha$ (ex340/em440) sur le pic $\alpha'$ (ex260/em450)	Indication sur la proportion de substances humiques par rapport aux matériels humiques plus récents	Baker et al.(2008), Cory et al. (2010)
<b>Rapport de pic <math>\alpha</math>/ <math>\beta</math> ou C/M</b>	<b>C/M</b>	Rapport de l'intensité des pics $\alpha$ (ex340/em450) sur le pic $\beta$ (ex300/em390)	Indication sur la proportion de substances humiques par rapport aux matériels biologiques	Coble (1996), Burdige et al. (2004), Para et al. (2010), Helms et al. (2013)
<b>Rapport de pic <math>\alpha</math>/ <math>\gamma</math> ou C/T</b>	<b>C/T</b>	Rapport de l'intensité des pics $\alpha$ (ex340/em450) sur le pic $\gamma$ (ex275/em310)	Indication sur la proportion de matériel humique plus récent par rapport aux matériels protéiques	Baker et al.(2008)
<b>Indice de « fraîcheur »</b>	<b><math>\beta</math> / <math>\alpha</math></b>	Rapport de l'intensité de fluorescence à une émission de 380nm (bande $\beta$ ), excitation 310nm et de l'intensité maximum à l'émission entre 450-500nm pour une longueur d'excitation de 370nm	Indication sur le caractère autochtone de la MOD (et potentiellement des apports microbiens); plus le rapport est élevé plus les apports autochtones sont grands	Parlanti et al. (2000), Wilson and Xenopoulos (2009)
<b>Fluorescence index</b>	<b>FI</b>	Rapport des intensités d'émission de fluorescence à 450nm sur 500nm pour une excitation de 370nm	Permet d'identifier la contribution relative de MOD terrestre ou microbienne associée au type de DOC	Mc Knight et al. (2001), Johnson et al (2011), Cory et al. (2010)
<b>Indice d'humification</b>	<b>HIX</b>	Rapport des aires définies respectivement par l'intervalle H:435-480nm divisé par l'intervalle L: 300-345nm pour une excitation à 250nm	Permet d'estimer la présence de MOD humifié ainsi que le degré d'aromaticité; de fortes valeurs de HIX indiquent la présence de matière organique humifiée, un faible HIX indique un degré d'aromaticité plus faible et des faibles masses moléculaires.	Ohno (2002), Ohno et al. (2007)
<b>Indice d'activité biologique</b>	<b>BIX</b>	Rapport des intensités de fluorescence à 380nm (maximum bande $\beta$ ) et celle à 430 (maximum bande $\alpha$ ) pour une longueur d'excitation à 310nm	Permet d'estimer la production autochtone de MOD dûe à l'activité biologique et ainsi la présence de matière organique franchement produite dans le milieu. Une valeur supérieure à 1 indique une MOD produit récemment et d'origine autochtone	Huguet et al. (2009)

### III Approches statistiques

Les méthodes analytiques précédemment décrites ont été appliquées avec pour objectif de répondre à deux grandes problématiques la caractérisation spatio-temporelle de la MOD et l'exploration des facteurs environnementaux pouvant agir comme facteurs de contrôle dans la dynamique et l'évolution de la MOD. Un échantillonnage a donc été entrepris dans les projets décrits précédemment pour un total oscillant entre 30 et 60 échantillons par projet. L'application de différentes techniques d'analyse de la MOD associée aux données environnementales a entraîné l'utilisation de plus de 23 variables descriptives par échantillon. La constitution de bases de données de cette ampleur implique l'utilisation d'outils de traitement adaptés afin de structurer et synthétiser l'information ou d'en dégager des tendances générales.

Ainsi dans un premier temps, la synthèse et le travail des données a reposé sur l'établissement de statistiques descriptives (telles que moyenne, médiane, écart-type) à l'aide des logiciels SigmaPlot (for Windows Version12.0) et RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016, Inc). Dans un deuxième temps les données ont été traitées à l'aide d'analyse en composantes principales.

#### 1 Les tests de corrélation : Spearman

Les coefficients de corrélation permettent de donner une mesure synthétique de la qualité de la relation entre deux variables numériques et du sens de la relation. Une valeur positive (maximum = +1) indique une variation simultanée dans le même sens de deux variables alors qu'une valeur négative (minimum = -1) signale une variation simultanée en sens inverse. Une valeur nulle indique l'absence de relations entre les deux variables. Ainsi ce coefficient de corrélation est caractérisé par son sens et par sa force. La force de la relation est définie par la valeur absolue du coefficient. Plus la valeur absolue du coefficient de corrélation est proche de 1, plus la relation est forte entre les deux variables. La p-value permet de s'assurer du côté significatif de la comparaison.

De plus cette approche statistique a déjà été utilisée pour l'étude de la MOD naturelle (Hunt and Ohno, 2007; Kellerman et al., 2014; Mattsson et al., 2009; Shutova et al., 2014). Ces tests de corrélation de Spearman ont été menés à l'aide de SigmaPlot (for Windows Version12.0).

#### 2 Modèle de régression linéaire

La régression est une des méthodes statistiques les plus connues et les plus appliquées pour l'analyse de données quantitatives. Elle a pour but d'établir une liaison entre une variable quantitative et une ou plusieurs autres variables quantitatives, sous la forme d'un modèle. Dans notre étude nous avons

utilisé des régressions multiples entre une variable « à expliquer » et plusieurs autres variables « explicatives ou prédictives ». Ainsi s'il existe une relation entre deux variables, le phénomène aléatoire de la variable « prédictive » peut prédire celui de la variable à expliquer. Dans le cas d'une régression multiple, le but est de tester plusieurs variables prédictives sur une même variable à expliquer. Le but est de mettre en avant des facteurs environnementaux comme étant potentiellement responsables de changements spécifiques de la MOD. De plus cette approche statistique a été déjà utilisée déployée pour l'étude de la MOD en milieu naturel (Bittar et al., 2016; Erlandsson et al., 2008; Vepsäläinen et al., 2009).

L'objectif de ce modèle dans notre travail a été de tester l'effet de facteurs environnementaux sur les variables descriptives de la MOD. Ces tests ont été menés à l'aide de RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016, Inc) et du package *Stats*.

### 3 Cartes de Kohonen : Self-Organizing Maps (SOM)

Une carte auto-organisatrice de Kohonen (Self-Organizing Kohonen Maps : SOM) est un réseau de neurones à apprentissage non supervisé. Cette technique permet dans un même temps de faire une classification objective des échantillons et d'étudier simultanément les variables environnementales et descriptives de la MOD. Le SOM est donc une puissante méthode pour classer les données complexes principalement orientées par des relations non linéaires. Un de ses avantages principaux est donc la prise en compte de gradients non-linéaires complexes, qui explique en partie sa grande efficacité pour décrire des variables et données environnementales. Cette technique a été appliquée à l'étude de la MOD en tenant compte principalement des composants PARAFAC (Cuss and Guéguen, 2015; Ejarque-Gonzalez and Butturini, 2014; Huibin Yu et al., 2015).

En revanche, comme pour les autres réseaux de neurones, de nombreux paramètres doivent être réglés, de façon adaptée aux différents types de jeux de données (nombre de neurones, mesures de dissimilarité, nombres d'étapes, fonctions de voisinages...)

L'analyse SOM a été réalisée sur des données centrées-réduites en unité de variance. Le réseau de Kohonen est constitué de deux couches de neurones : une première couche (couche d'entrée) est reliée à chaque vecteur de l'ensemble de données et la seconde couche (couche de sortie) représente la carte de Kohonen, une matrice bidimensionnelle de neurones hexagonaux disposés sur une grille. Dans chaque hexagone, un vecteur de référence est pris en considération. Les vecteurs de référence correspondent à des unités d'échantillonnage virtuel avec des descripteurs calculés. Dans la couche de sortie, les unités de la grille (unités d'échantillonnage virtuel) donnent une représentation de la répartition des unités d'échantillons réels d'une manière ordonnée.

Un résultat direct de l'algorithme SOM est une distribution des échantillons sur la carte topologique SOM. Selon les propriétés de l'algorithme, les échantillons qui se trouvent dans la même cellule sont très similaires, et similaires à celles des cellules voisines. Dans ce travail, les paramètres ont été choisis en fonction de l'étude de Kohonen (Kohonen, 2001, chapitre III) comme suit: cartes rectangulaires plates; le noyau de voisinage est selon une fonction gaussienne; le nombre d'itérations est de 500 fois le nombre d'unités de la carte avec 2000 itérations pour la phase de commande de l'apprentissage.

En outre, les valeurs des descripteurs de chaque unité d'échantillonnage virtuelle ont été utilisées pour afficher la distribution de chaque variable sur la carte organisée sur laquelle ont été tracés des échantillons réels. Un gradient de nuance de gris a été utilisé pour représenter les valeurs des descripteurs. Cette représentation bidimensionnelle peut être considérée comme un «composant ». Ensuite, une analyse de clustering classique du SOM en utilisant la méthode Ward a été utilisée. Cette méthode est appliquée aux résultats du modèle SOM, ou plus précisément sur les unités d'échantillonnage virtuel de la couche de sortie.

Pour explorer l'ensemble des données, la carte d'auto-organisation (SOM) (Kohonen, 2001) a été utilisée avec un fichier (algorithme) écrit par les auteurs (Giraudel et Lek, 2001).





Chapitre III Optimisation et évaluation de la  
technique de fractionnement par couplage flux  
force pour l'étude de la MOD



Ce chapitre présente le développement méthodologique du fractionnement par couplage flux-force avec flux asymétrique pour l'étude de la MOD. Le but était d'optimiser différents paramètres influençant la séparation (phase mobile, flux...) et définir une méthode appropriée pour l'étude de la MOD des milieux aquatiques naturels.

La FFF a été décrite comme la technique la plus flexible et efficace pour le fractionnement et la séparation de colloïdes environnementaux (MOD) en termes de gamme de séparation, sélectivité, résolution, reproductibilité et de couplages possibles (S. Dubascoux et al., 2008; Giddings, 1993; Gigault et al., 2013). Jusqu'au début des années 2000, les études sur les composés organiques par FFF ont été réalisées en utilisant des systèmes de fractionnement par couplage flux force symétrique (Benedetti et al., 2003; Geckeis et al., 2003; Lead et al., 2000a; Stolpe et al., 2005; Zanardi-Lamardo et al., 2004). Aujourd'hui les études de la MOD naturelle se font principalement par fractionnement par couplage flux force avec flux asymétrique (AF4). A la fin des années 1990, Schimpf et al ont développé et appliqué l'AF4 à l'étude de substances humiques extraites de sols (Schimpf and Petteys, 1997; Schimpf and Wahlund, 1997). A partir de là des études ont été menées afin d'optimiser l'AF4 en termes de flux, de phases mobiles (pH et force ionique), membranes ou espaceurs, pour la matière organique (Bolea et al., 2010, 2006; S. Dubascoux et al., 2008; Kammer et al., 2011; Neubauer et al., 2011; Prestel et al., 2005).

Ainsi dans le fractionnement par AF4, de nombreux paramètres peuvent avoir une influence sur la séparation, l'efficacité du fractionnement et la reproductibilité de la méthode. Plus précisément, les conditions d'analyse (flux principal, flux croisé, flux d'injection, volume d'injection, temps de focus) et la composition de la phase mobile (type de sel, pH, force ionique) peuvent varier et modifier les caractéristiques physico-chimiques des particules analysées ou bien de la membrane et donc la qualité et la reproductibilité de la séparation (Alasonati et al., 2007; S. Dubascoux et al., 2008; Durce et al., 2016).

Dans cette partie, l'objectif est de décrire et définir les paramètres clés à optimiser pour le fractionnement de colloïdes (MOD) d'origine aquatique naturelle par fractionnement par couplage flux force et au final fixer une méthode d'analyse la plus fiable, efficace et robuste pour l'étude de la MOD dans des environnements aquatiques diverses. Pour ce faire, des échantillons de MOD standardisés (IHSS) ont été utilisés.

De plus au cours de cette optimisation, une comparaison entre la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et l'AF4 a été réalisée dans le cadre de la caractérisation des molécules organiques de trois étapes successives de vinification du raisin. Cependant étant donné les différences entre les matrices, vin et eaux naturelles, les résultats de cette étude ne sont pas développés dans ce manuscrit

et sont simplement présentés dans l'article « Asymmetrical Flow Field Fractionation of white wine chromophoric colloidal matter » donné en annexe 1.

Dans un premier temps, une démarche d'optimisation a été menée afin d'obtenir une méthode de calibration robuste à l'aide d'une série de macromolécules organiques pouvant avoir un comportement proche de la MOD permettant de tester les conditions de séparations et de servir d'étalons pour des courbes de calibration de 1 à 66kDa (vitamine B12, Aprotinine, Cytochrome C, Lysozyme, Myoglobine, Carbonic anhydrase, Albumine et Bovine Albumine Serine).

Dans un deuxième temps, la phase mobile a été optimisée, tout d'abord en termes de concentration à l'aide de tampon phosphate entre 0mM et 50mM (0 ; 0,1 ; 1 ; 5 ; 10 ; 25 et 50mM) puis de composition à l'aide de six sels (Nitrate de sodium, Chlorure de calcium, Nitrate d'ammonium, Chlorure de magnésium, Chlorure de sodium et du tampon phosphate). Cette optimisation a montré que la concentration et la composition étaient des paramètres importants à prendre en compte et que dans nos conditions une phase mobile composée de tampon phosphate à 5mM était optimale pour obtenir une bonne séparation de MOD.

Par la suite le cross-flow et le temps de focus ont été optimisés afin d'obtenir un compromis entre meilleure résolution et taux de recouvrement afin de ne pas perdre un pourcentage trop important d'échantillon sur et à travers la membrane. Le cross-flow optimal a été défini à 3mL/min pour un temps de focus de 2 minutes. Finalement, différents échantillons naturels provenant de rivières et estuaires ont été analysés afin de valider la méthode.

Cette optimisation a été rédigée dans ce qui suit sous forme d'article pour soumission dans *Journal of Chromatography A*.

# Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation for the investigation of aquatic dissolved organic matter molecular weight

To be submitted to *Journal of Chromatography A*

## **Abstract**

The separation of dissolved organic matter (DOM) using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) was optimized by evaluating different parameters such as ionic strength/composition of the mobile phase and crossflow rate. Seven ionic strengths and six compositions of carrier solution were evaluated. The quality and efficiency of the fractionation were evaluated on a calibration curve using a series of eight standards organic molecules and DOM standards. Four parameters were used: coefficient of determination of the calibration curve, time of analysis, recovery and molecular weight determination. Ultraviolet/visible spectrophotometer (UV) provided the monitoring during the analysis and the evaluation of the efficiency of separation. The mobile phase with phosphate buffer at 5mM allowed us to obtain the highest coefficient of determination, recoveries and molecular weight of DOM standards in accordance with previous studies. The crossflow rate was investigated in order to get the best separation with and after the void peak and to avoid membrane-sample interaction.

Robust and applicable conditions were proposed for a good separation and characterization of low molecular weight DOM using AF4.

**Keywords:** Natural dissolved organic matter, Molecular weight distribution, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation; Optimization; Aquatic ecosystems

## I Introduction

Natural dissolved organic matter (DOM) in aquatic ecosystems is the largest pool of carbon. DOM plays a major role in the biogeochemical processes and cycling of carbon, nutrients and inorganic/organic contaminants (Wells, 2002). Colloidal dissolved organic matter is a heterogeneous mixture containing a large range of sizes or molecular weights and chemical specifications (Benner and Amon, 2015; Guéguen et al., 2012). Environmental colloids, such as DOM, are of high interest because of their role especially in pollutant and trace element mobility, bioavailability and transfer (Aiken et al., 2011; Buffle and Leeuwen, 1992). Natural colloids are extremely diversified due to the large variety of entities and origins in environmental media such as soils, organisms, micro-organisms, their associations, aggregates and many others (Buffle and Leppard, 1995). But, knowledge on chemical aspects and size distributions of the colloidal and dissolved organic matter remains insufficient and infrequent.

Different techniques have been used and existed to separate colloids and nanoparticles. Initially, the ultrafiltration techniques have advanced our understanding of aquatic colloids distribution (Benner et al., 1997; Logan and Jiang, 1990; Ogura, 1974). Then size exclusion chromatography, capillary electrophoresis, sedimentation, centrifugation and field flow fractionation (FFF) were also applied to study DOM. Even though ultrafiltration methods only give a cut-off fractionation, they still have been the most used fractionation techniques for environmental colloids. FFF could be the most capable and flexible technique for the separation of environmental colloids according to its size range, selectivity, resolution and its coupling capacity (Giddings, 1993). FFF theory is now well known and described (Schimpf et al., 2000). The FFF techniques have been used in a large field of applications: polymer technology, biotechnology, pharmaceuticals, biopharmaceuticals and environmental chemistry (Baalousha et al., 2011; S. Dubascoux et al., 2008; Messaud et al., 2009; Reschiglian et al., 2005). Among other FFF techniques, flow field flow fractionation (FIFFF), a chromatography-like technique, is one of the most appropriate for the study of aquatic colloids. The retention times of colloids are proportional to their hydrodynamic diameters (Zanardi-Lamardo et al., 2002). One of the main difference between FIFFF and chromatography is that the separation is not based on analytes/stationary phase interaction but on interaction between analytes and a non-uniform flow (Schimpf et al., 2000). The separation is based on a secondary flow (crossflow) applied perpendicularly to the main one in order to provide a retention field.

In asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) the separation is performed in a semi-permeable channel using a membrane that can be characterized by variable cut-offs (30, 10, 1 kDa) and natures (regenerated cellulose, polyether sulfone, etc.). Depending on the thickness of the AF4 channel, the space between membrane and wall, the main channel flow (detector flow) is parabolic during the elution. AF4 fractionation is based on the diffusion coefficient of the analytes. This coefficient can be

deferred to the size given by calibrated correlations between size and diffusion coefficient of colloids (Benincasa and Giddings, 1992). Larger colloids are eluted later due to their smaller diffusion coefficient and inability to diffuse against the retention field, whereas smaller colloids are eluted faster (Baalousha et al., 2006a). The coupling to specific online detectors enables a detailed characterization of colloids properties associated to their sizes. AF4 permits thus to have separation and characterization of aquatic colloids simultaneously (Baalousha et al., 2011; Stolpe et al., 2010a). AF4 has then been used for separation and characterization of natural colloids such as DOM in seawaters (Hassellöv, 2005; Stolpe et al., 2014), river waters (Cuss and Guéguen, 2013; Guéguen and Cuss, 2011; Stolpe et al., 2010a), soils (S. Dubascoux et al., 2008) and other environments (Cuss and Guéguen, 2013). However the majority of the studies on characterization and fractionation of DOM in aquatic environments using AF4 were focused on humic substances (Benincasa et al., 2003; Bolea et al., 2006). Some studies have reported AF4 size distributions of natural DOM, giving apparent molecular weight distribution between few hundred to few thousand Dalton (Da) (Guéguen and Cuss, 2011; Stolpe et al., 2010a). The recovery in AF4 is generally lower than 50% even if the separation conditions are optimized (Neubauer et al., 2011; Stolpe et al., 2014). A non-negligible amount of DOM can thus be lost during the separation through or on the membrane, mainly during the focusing step and the elution step, due to the applied crossflow (on the membrane).

Moreover in AF4, many parameters have a great influence on the fractionation/separation efficiency and reproducibility. More specifically, separation conditions (detector flow, crossflow, focus flow and injected volume) and mobile phase composition (chemical composition, ionic strength and pH, membrane nature and cut-off) can change and modify the physico-chemical characteristics of molecules during analysis, and thus the retention times of the colloids (Alasonati et al., 2007; Durce et al., 2016).

The objective of this work was to describe and find the key factors to optimize the fractionation of natural colloids from aquatic ecosystems and finally to determine DOM molecular weight distributions. In addition, the effect of different parameters such as mobile phase composition and ionic strength, or applied cross-flow rates were tested to optimize the AF4 methods and to characterize heterogeneous natural samples. Mobile phase concentration is well known to play a major role on the fractionation efficiency and on sample recovery (Schimpf et al., 2000), as demonstrated in a number of papers dealing with different electrolytes and surfactants (S. Dubascoux et al., 2008; Herrero et al., 2015; Schimpf et al., 2000; Wahlund, 2014). On the one hand, phosphate buffer, previously used in AF4 in carrier liquid (Lee et al., 2015; Pifer and Fairey, 2012; Yohannes et al., 2005), was chosen to test the effect of the ionic strength on the fractionation efficiency of the organic and DOM standards. On

the other hand, phosphate buffer, sodium nitrate, calcium chloride, ammonium nitrate, magnesium chloride and sodium chloride were tested to define the best eluent.

The second aim of this work was to develop a calibration method sufficiently robust in reproducibility and time to be used as a standard calibration curve using a mixture of organic molecules like proteins, vitamins and enzymes. Only the ultraviolet/visible (UV) detector was used to check the quality of the AF4 fractionation using a well-calibrated membrane, recovery rates, MW distribution of standard molecules, DOM standards and natural samples. Finally the applicability of the optimized method developed was tested on a series of natural samples.

## II Theory

This part details the equations used in this work to evaluate the recovery of the particles during fractionation and to link the retention time to the apparent molecular weight.

### 1 Recovery calculations

The percentage of recovery for an AF4 experiment, hence the ratio between recovered mass after analysis and injected mass, is often below 100% due to membrane interaction or aggregation and the very low molecular weight components which pass through the membrane. This parameter is however commonly used to evaluate the fractionation efficiency (Schimpf and Petteys, 1997). Relative recoveries were determined by integrating fractograms obtained by recording the 254 nm UV absorbance signal during the AF4 separation. Recovery percentages were made by using injections of sample without and with any crossflow. A 100% recovery was assumed for flow injections of samples through the AF4 channel (no cross flow). Then, injections with an effective fractionation, elution with crossflow, were realized. After each injection, peak areas were calculated and the recovery (R) was expressed with Equation III-1.

*Equation III-1*

$$R (\%) = A/A_0 * 100$$

with

A= peak area obtained with crossflow

A<sub>0</sub>= peak area obtained without crossflow

Because UV signal can be efficient for all range size from natural organic matter, recoveries were calculated from signals from UV detectors in order to have an evaluation as reliable as possible.

## 2 Relationship between retention time and molecular weight

For asymmetric system, the fractionation in normal mode is determined by the diffusion coefficient of the analytes and thereby by their hydrodynamic radius  $R_h$ . The hydrodynamic radius  $R_h$  can be related to the molecular weight (MW) using a calibration curve.

The aim of this work was to obtain a realistic and representative calibration curve for molecular weights, by using standards as similar as possible to the environmental colloids in their density, shape, and relevant physical properties. However due to the heterogeneous nature of DOM, it might be difficult to find representative standards (Cho et al., 2000). In the past, polystyrene sulfonate (PSS) standards have been used for DOM characterization or for other applications (Alasonati et al., 2010; Beckett et al., 1987b; Schimpf et al., 2000). But PSS standards have very specific and stable physical properties and shapes, without any according compartment with DOM. However, proteins, vitamins or enzymes with optical, electrochemical and physical properties close to DOM have recently been used to estimate the MW distribution of aquatic colloids by AF4 (Guéguen and Cuss, 2011; Stolpe et al., 2010a).

A series of protein, vitamin and enzyme standards (all from Sigma Aldrich, St. Louis, MO) with known MWs, diffusion coefficients and hydrodynamic diameters, as listed in Table III-1, was used to calibrate the AF4 system and to establish a relationship between retention time, diffusion coefficient and molecular weight of colloids under specific instrument conditions (membrane molecular weight cut-offs (MWCs), carrier solutions and flow settings). Based on this relationship, the retention time of macromolecules or natural DOM can be readily converted to diffusion coefficient/molecular weight using the Stokes-Einstein law and MWs following the Equation III-2 below:

*Equation III-2: Rearrangement of the Stokes-Einstein's equation*

$$D = \frac{\lambda V_c \omega^2}{V_0}$$

With

D: diffusion coefficient

$V_c$ : cross-flow rate

$\omega$ : channel thickness

$V_0$ : channel void volume

Equation III-2 can be used to determine the values of the diffusion coefficient and the molecular weight.

Calibration was performed with 8 macromolecules prepared in ultra-pure water (Milli-Q, Millipore) (Table III-1).

Table III-1 : List of organic molecules used as molecular weight standards

Name	Molecular weight (Da)	Absorbance maximum (nm)	Diffusion coefficient (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Hydrodynamic diameter (nm)	Purity or grade	
Vitamin B12	1350	355	1.7 × 10 <sup>-10</sup>	1.7	≥98%	Sigma-Aldrich
Aprotinin from bovine lung	6500	280	2.54 × 10 <sup>-10</sup>	2.7		Roche
Cytochrom C from bovine heart	12400	405	1.3 × 10 <sup>-10</sup>	3.4	≥95%	Sigma-Aldrich
Lysozym muramidase from hen egg white	14300	270	1.04 × 10 <sup>-10</sup>	3.78 3.4	≥95%	Roche
Myoglobin from horse heart	17000	200	1.03 × 10 <sup>-10</sup>	3.83	≥90%	Sigma-Aldrich
Carbonic anhydrase from bovine erythrocy	29000	280	1.14 × 10 <sup>-11</sup>	5.2	≥2,500 W-A units/mg protein	Sigma-Aldrich
Albumin from chicken egg white	44287	280	7.76 × 10 <sup>-11</sup>	5.84	≥98%	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin, monomer	66500	280	6.15 × 10 <sup>-11</sup>	6.979	≥98%	Sigma-Aldrich

A calibration curve with retention time versus log MW (Equation III-3) for each mobile phase and analysis day was plotted (Figure III-1) and the coefficient of determination of the curve R<sup>2</sup> allowed us to validate the separation. Using the curve equation and the retention time, the apparent molecular weight (AMW) for each sample and DOM standards were calculated using Equation III-4. To ensure that the separation was efficient also for large molecules, the macromolecule bovine serum albumin was used. And also to ensure that the calibration regression was available to be used, the higher MW standard, bovine serum albumin, was removed from the calibration regression and neither the slope nor the correlation coefficient changed significantly.

Equation III-3: Equation of the calibration curve

$$RT = a \log(AMW) + b$$

With

RT=retention time

AMW=apparent molecular weight



Equation III-4: Equation used to define the apparent molecular weight

$$AMW = 10^{\left(\frac{RT-b}{a}\right)}$$

The organic molecules used for the calibration were injected twice, as single solutions, in order to confirm the retention, and hence their molecular weight. The retention times of the peak maxima were normalized to the void peak obtained with the DAD.

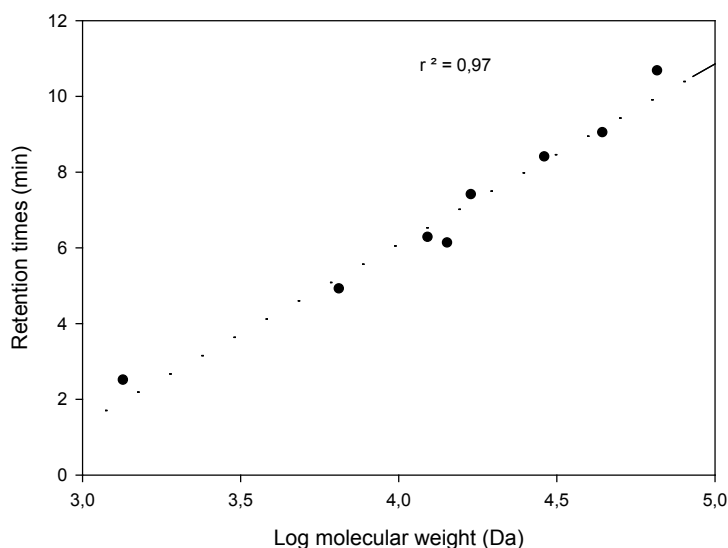


Figure III-1: Example of calibration curve using eight organic standards

### 3 Measurements of DOM standards

Two DOM samples, Suwannee River Fulvic Acid Standard II (SRFA) and Pahokee Peat Fulvic Acid Standard II (PF) purchased from the International Humic Substances Society (IHSS), were measured with the AF4 system to examine the effect of MWCO and carrier solutions on their colloidal size distributions, recoveries, and resolutions.

## III Experimental

### 1 Chemicals

Sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 98%), sodium dihydrogen phosphate dodecahydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 98%), sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ , 99%), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ , 100%) were purchased from Prolabo (Prolabo from VWR). Ammonium nitrate ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , 100%) was obtained from Merck (Merck, Darmstadt, Germany). Magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 99%) and sodium chloride ( $\text{NaCl}$ , 99.5%) were purchased from Scharlau (Spain). Sodium Hydroxide ( $\text{NaOH}$ , 99%) used to adjust mobile phase pH was purchased from Sigma–Aldrich. The Milli-Q water used was 18 M $\Omega$

(Millipore System, Bedford, MA, USA). Filters used for carrier solutions were Durapore 0.1  $\mu\text{m}$  from Millipore.

*Table III-2 List of carrier solution used*

<b>Composition</b>	<b>pH</b>	<b>Ionic strength (mM)</b>
$H_2O$		0
Phosphate Buffer $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.2	0.1
Phosphate Buffer $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.2	1
Phosphate Buffer $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.2	5
Phosphate Buffer $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.2	10
Phosphate Buffer $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.2	25
Phosphate Buffer $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.2	50

## 2 Instrumentation

The asymmetrical flow field-flow fractionation system used was an Eclipse 3 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany). The trapezoidal channel was 14.5 cm in length and 0.6 and 2.1 cm in width and the spacer had 490  $\mu\text{m}$  thickness. For all the experiments, the membranes used were 1 kDa MWCO polyethersulfone (PES) membrane (Wyatt Technology). Flows were controlled with an Agilent Technologies 1200 series isocratic pump equipped with a micro-vacuum degasser. Following separation various detectors were used to collect information about the eluting fractions. An ultraviolet/visible detector (Agilent G1315A, Agilent Technologies 1200 series from Agilent, Tokyo, Japan) was used to record the absorbance signal at a pre-defined wavelength tuned at 254 nm.

All injections were performed with a manual injection system using a 1mL sample loop. Results from UV were collected and analyzed by ASTRA 6.1.5.22 software (Wyatt Technology).

After changing the membrane or when the carrier liquid composition of the mobile phase was changed the system was flushed with a flow of 1 ml/min in detector flow, cross-flow and focus flow for 30 min to allow equilibration. To certify the absence of memory effect between series of injection, blanks with mobile phase were made and compared with the blank just after the new membrane. A series of standards injection was performed and the results were compared with the latest standard injections to ensure that the fractionation was equivalent than before.

### 3 Experimental conditions

Each analysis, as detailed in Table III-3, was performed with an injection of 100 $\mu$ L using a 1mL sample loop. To test the effect of these operating conditions on the dissolved/colloidal organic matter, different sets of experiments were run. (1) The effect and role of the carrier ionic strength were tested by increasing the molarity concentration from 0 to 50mM of phosphate buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O (pH 7.2); (2) the influence of salt composition on the separation was compared using sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>), ammonium nitrate (NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>), calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) and phosphate buffer at 5mM (pH7.2); (3) the effect of the field strength on the fractionation was studied by varying the cross-flow rate between 0 and 3mL/min and focus time from 1 to 8 minutes.

The different salts used allowed us to verify the effect of monovalent, divalent, cationic and anionic ions in the mobile phase on the separation of organic molecules like dissolved organic matter.

*Table III-3: AF4 normal conditions*

<b>FFF</b>	
<b>Membrane</b>	1kDa polyether sulfone (Wyatt)
<b>Sample injection</b>	100 $\mu$ L
<b>Inject flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	0.2
<b>Detector flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	1
<b>Focus flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	2
<b>Focus time (min)</b>	1 to 8
<b>Cross flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	0 to 3
<b>Cross-flow time (min)</b>	15 to 25
<b>UV-Vis detector</b>	
<b>Absorbance (nm)</b>	254

## IV Results and discussion

### 1 AF4 optimization

AF4 theories and principles have been described in several studies (Baalousha et al., 2011; Déjardin, 2013; Håkansson et al., 2012; Herrero et al., 2015; Magnusson et al., 2012; Schimpf et al., 2000; Wahlund, 2014, 2013; Wahlund et al., 1987). Multitudes of parameters can be modified and adjusted to optimize the fractionation as carrier liquid, cross-flow, detector flow, focus flow, spacer thickness, membrane nature, membrane cut-off, injection time and focusing time. Some papers have described the effects of these parameters (Baalousha et al., 2011; Neubauer et al., 2011) and the fact that all of these factors need to be considered in the development of improved methodologies for the AF4 separation. However, the optimization on carrier liquid composition, ionic strength and cross-flow/focus flow using AF4 coupled with UV detector has not been clearly explained before for DOM characterization.

In this optimization part, the aim was to determine the optimal conditions giving the highest sample recovery and an efficient separation without specific losses for very low molecular weight molecules. Indeed, in order to evaluate the AF4 fractionation efficiency, the recovery and the quality of the fractionation have to be considered. The retention time of particles is one of the most important parameter. They have to be neither too short to avoid elution in the void peak without any fractionation nor too long with regard to analysis duration.

The preliminary results using pure water as carrier liquid flow were not satisfactory, with short retention times, a large void peak and a bad resolution of separation. The presence of electrolytes in the mobile phase is necessary to have electrostatic repulsion between analytes and membrane. It is well documented that this repulsion is reduced to allow the stabilization and equilibrium of the particles closer to the membrane and give longer retention times and a better resolution/separation (Kammer et al., 2011).

#### *a Relationship between retention time and macromolecular sizes*

The fractionation and performances of the AF4 system with different ionic strengths were then calibrated for a series of organic macromolecules (Table III-1). The linear regression correlations between retention times and logarithm of molecular weight of organic macromolecules were measured for the seven mobile phases (Table III-2) including 0mM ( $r^2= 71.6\%$ ,  $p=0.0338$ ), 0.1mM ( $r^2=$

80.6%,  $p=0.0151$ ), 1mM ( $r^2= 96.8\%$ ,  $p=0.0004$ ), 5mM ( $r^2= 96.7\%$ ,  $p<0.0001$ ), 10mM ( $r^2=95.7\%$ ,  $p<0.0001$ ), 25mM ( $r^2=93.5\%$ ,  $p<0.0001$ ), 50mM ( $r^2=94.2\%$ ,  $p<0.0001$ ).

These results allowed us to draw the first conclusions in accordance with the AF4 theory concerning the linearity of the response between retention times and the molecular weight of organic macromolecules in a size range between 1.3kDa and 66 kDa and the quality of the calibration curve using these eight standards.

### *b Concentration of the mobile phase*

The ionic strength of the carrier solution affects electrostatic repulsions. Seven concentrations of carrier solution, as listed in Table III-2, were used to examine the influence on coefficient of determination of the calibration curve, separation time (elution time) of a series of standard organic molecules. Recoveries and determination of apparent molecular weight of standard DOM samples were also determined under the same AF4 conditions with 1kDa PES membrane (Table III-3).

For the standard series of eight organic molecules, as listed Table 1, the coefficients of determination of the calibration curve were 0.72, 0.81, 0.97, 0.97, 0.96, 0.93 and 0.94 when the carrier solution with 0mM, 0.1mM, 1mM, 5M, 10mM, 25mM and 50mM of phosphate buffer were used respectively, showing the best coefficients of determination of the calibration curve for carrier solution with 1mM, 5M, 10mM in ionic strength (Figure III-2).

Moreover, the ionic strength of the mobile phase affected the elution time of the eight organic molecules used as molecular weight standards. Indeed the comparison of separation times, time between the first peak, vitamin B12, and the last one, BSA, showed a pronounced effect of the ionic strength, i.e., 2.57, 7.05, 8.16, 8.14, 8.08, 7.71min respectively for 0.1mM, 1mM, 5M, 10mM, 25mM and 50mM of phosphate buffer (Figure III-2). The carrier solution ionic strength thus affected the elution time of known organic molecules.

The change in recoveries for UV absorbance was significant, 69%, 71%, 98%, 99%, 69%, 57% and 66% for SRFA and 99%, 95%, 115%, 113%, 91%, 80% and 49% for PF for carrier solution with 0mM, 0.1mM, 1mM, 5M, 10mM, 25mM and 50mM of phosphate buffer respectively (Figure III-2). For both IHSS DOM standards, recoveries were better, around 100%, using an ionic strength of 1 and 5mM. The effect of the ionic strength on the recovery of DOM standards was then significant. Furthermore, the ionic strength of the carrier solution also affected the molecular weight of the DOM standards, SRFA and PF, determined by using the calibration curve of eight organic molecules between 1.35kDa and 66kDa, showing an effect on the elution time. The comparison of previous studies, for which SRFA molecular weight has been determined between 1910 and 2364Da using different systems and ionic conditions

with sodium chloride or phosphate buffer and sodium sulfate (Guéguen and Cuss, 2011; Guo and Santschi, 1996; Her et al., 2003; O'Loughlin and Chin, 2001), showed that the ionic strength influences significantly the calibration curve and finally the molecular weight determination. The molecular weights of SRFA measured in this work were 6084, 1118, 1492, 1942, 1798, 2062 and 2018 Da with 0mM, 0.1mM, 1mM, 5M, 10mM, 25mM and 50mM of phosphate buffer respectively. Finally, only the molecular weight distribution of SRFA using the calibration curve with 5mM phosphate buffer agreed with previous studies. As regards PF, the differences of molecular weights with the ionic strength were in the same range as SRFA (Figure III-2).

A clear relationship between salt concentration and AF4 separation could be established. As expected, this concentration has a significant effect on a multitude of parameters (Lee et al., 2015). Moreover, the behavior of natural DOM, especially charged molecules, in AF4 depends on the molecular volume resulting in intramolecular and intermolecular repulsions (Benincasa et al., 2002a; Ratanathanawongs Williams et al., 2000). Then, the ionic strength of the mobile phase fixed by the salt concentration in the solution is one of the most important parameter for the separation of low molecular weight organic molecules separation. Indeed, at lower ionic strength concentrations, the electrostatic double layer of the membrane is more diffuse and increases the equilibrium height of the molecules in the channel. On the contrary, an increase in the ionic strength leads to a decrease of the thickness of the electrostatic double layer which directly determines the real channel thickness of the separation (Ulrich et al., 2012; Wahlund, 2013).

To summarize, one of the challenges in FFF with complex samples, such as DOM, is to provide the ideal compromise in terms of ionic strength of the carrier solution to obtain the best separation. A mobile phase with 5mM of phosphate buffer was shown to provide the best results in regards to the coefficient of determination of the calibration curve, separation time, recoveries and molecular weight of SRFA and PF.

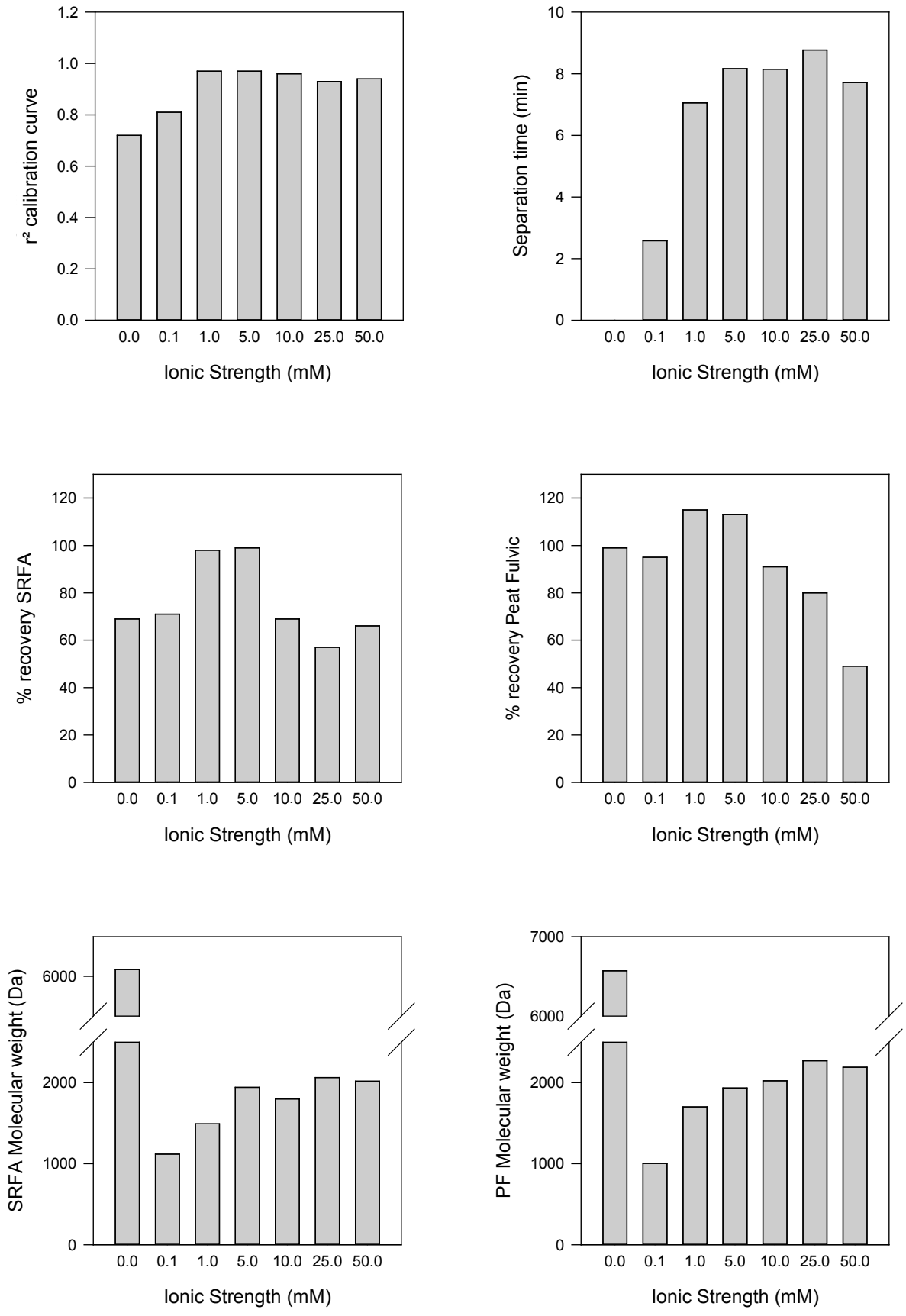


Figure III-2: Effect of the ionic strength on the (a) coefficient of determination of the calibration curve (%), (b) separation time (min), recoveries of (c) SRFA and (d) PF (%) and molecular weight of (e) SRFA and (f) PF (Da)

### *c Composition of the mobile phase*

As salt concentration has an influence on the different parameters, 5mM of ionic strength was then chosen to follow the investigation. The nature of the carrier solution is another crucial parameter in AF4 because it affects the stability and also the interaction of particles with the membrane. The salt nature is well known to impact the separation quality according to the type of ions: monovalent, divalent, cationic or anionic (Benincasa et al., 2002b). For these reasons, six different salts,  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and  $\text{NaCl}$  were used to define their influence on the coefficient of determination of the calibration curve, separation time (elution time) of a series of standard organic molecules and on the recoveries and the determination of apparent molecular weight of standard DOM samples under the same AF4 conditions (Table III-3) with 1kDa PES membrane.

For the standard series of eight organic molecules, as listed Table III-1, the coefficients of determination of the calibration curve were 0.72, 0.93, 0.93, 0.80, 0.97 and 0.78 with  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , phosphate buffer and  $\text{NaCl}$  carrier solution respectively, showing the best coefficients of determination of the calibration curve for  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$  and phosphate buffer (Figure III-3).

Furthermore, the mobile phase composition affected the elution time of the eight molecular weight standards. The comparison of separation time, time between the first peak, vitamin B12, and the last one, BSA, showed a pronounced effect of the salt nature, i.e., 6.81, 7.12, 10.10, 10.13, 8.16 and 9.36 min respectively for  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , phosphate buffer and  $\text{NaCl}$  (Figure III-3). In terms of separation times, the best results were obtained for  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{NaCl}$ . The change in recoveries for UV absorbance was significant, 88.52 ( $\pm 5.46$ ), 87.70 ( $\pm 3.04$ ), 30.36 ( $\pm 5.77$ ), 47.37 ( $\pm 3.50$ ), 98.78 ( $\pm 11.57$ ) and 70.54 ( $\pm 8.49$ ) % for SRFA and 91.75 ( $\pm 5.16$ ), 117.18 ( $\pm 2.99$ ), 42.90 ( $\pm 0.89$ ), 66.39 ( $\pm 4.04$ ), 113.40 ( $\pm 8.61$ ) and 84.16 ( $\pm 1.37$ ) % for PF for carrier solution with  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , phosphate buffer and  $\text{NaCl}$  respectively (Figure III-3). The recoveries obtained according to salt composition of the mobile phase were significantly different whether with SRFA or PF. For both, the best salt composition was  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  and phosphate buffer with recoveries around 90 – 100% or upper to 100%. A clear relation between salt composition and recoveries can be established. Furthermore, the salt nature of carrier solution showed some effect on the molecular weight determination of the IHSS DOM standards, SRFA and PF, by using the calibration curve with eight organic molecules between 1.35kDa and 66kDa.



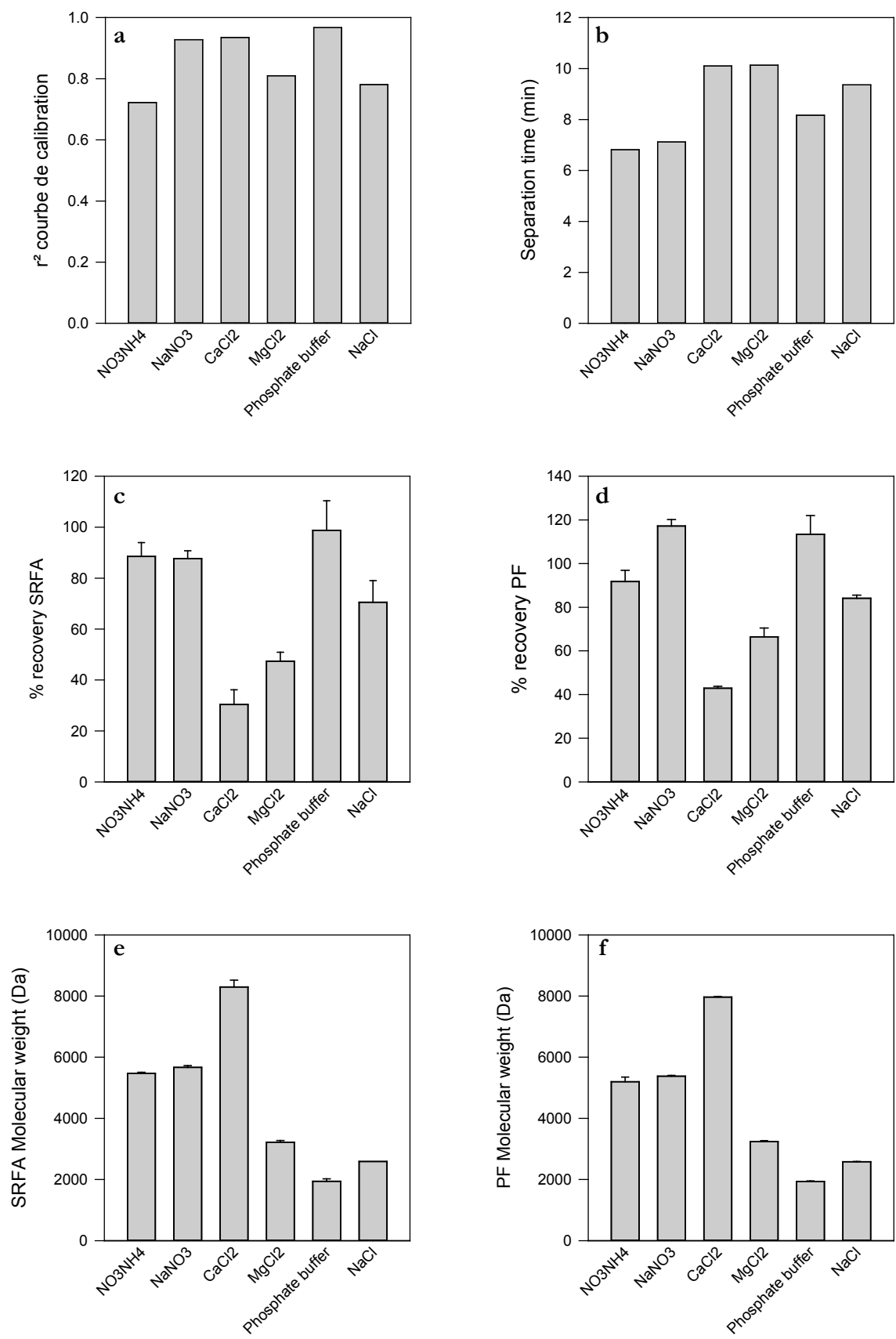


Figure III-3: Effect of the mobile phase composition on the (a) coefficient of determination of the calibration curve (%), (b) separation time (min), recoveries of (c) SRFA and (d) PF (%) and molecular weight of (e) SRFA and (f) PF (Da)

The comparison of the SRFA molecular weight obtained in previous studies showed a clear relationship between salt nature in the mobile phase and molecular weight determination. In previous studies, SRFA molecular weights were between 1910 and 2364Da (Guéguen and Cuss, 2011; Guo and Santschi, 1996; Her et al., 2003; O'Loughlin and Chin, 2001) while in this study, respectively with  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , phosphate buffer and  $\text{NaCl}$ , SRFA molecular weights measured were 5473 (35), 5666 (60), 8294 (224), 3217 (57), 1942 (79) and 2587 (0)Da (Figure III-3). The SRFA MW obtained according to mobile phase with phosphate buffer was the only one in the same range of values with the previous studies. Peat Fulvic molecular weight determinations using the different salt natures showed equivalent trends as with SRFA (Figure III-3). The effect of the salt nature on the molecular weight determination of standard DOM was confirmed.

The salt nature of the mobile phase is thus a key factor in AF4 separation because it could impact the separation and the diffusion of the analytes (Figure III-3) and also modify the interactions with the membrane (Figure III-3) as previously reported (Alasonati et al., 2007; S. Dubascoux et al., 2008; Gimbert et al., 2003). As regards the type of ion – monovalent, divalent, cationic or anionic – it can directly influence the separation time or SRFA and PF recoveries. For divalent ion -  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  – the separation time was significantly higher than for the others and SRFA and PF recoveries were significantly lower. Authors (Durce et al., 2016) showed for  $\text{Ca}^{2+}$ , that the presence of divalent cation in the mobile phase –  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in  $\text{MgCl}_2$  – promotes DOM aggregation which could lead to a reduction of recoveries and also an overestimation of the molecular weight. As regards the other parameters, the coefficient of determination of the calibration curve and SRFA and PF molecular weights did not show any relation with the type of ions in the carrier solution.

According to these results, the optimal composition of the carrier solution appeared clearly to be the phosphate buffer at 5mM and pH 7.2.

#### *d Effect of the crossflow rate and focus time*

Mobile phase composition and salt concentration have thus a major influence on the separation quality, separation time, recoveries and the molecular weight determination, but the two main parameters which control the distribution and the diffusion of the analytes along the channel thickness, and so their separation, are the crossflow rate and the focus flow time (Alasonati et al., 2007; Stéphane Dubascoux et al., 2008; Hartmann and Williams, 2002).

A too low crossflow gives a no particle separation, all the analytes being eluted with or too quickly after the void volume. A too high crossflow gives rise to a very long separation time and could induce irreversible adsorption onto the membrane and loss across the membrane. Figure III-4A/B shows the

influence of the crossflow rate on particle fractionation. When increasing a constant crossflow rate from 0 to 3 mL.min<sup>-1</sup>, the retention time at the peak maximum of SRFA and of the natural samples shifted to higher values. In the Figure III-4A the SRFA recoveries were 98%, 91%, 92% and 98% respectively for the crossflow rate at 0, 1, 2, 3 mL.min<sup>-1</sup> during 15 minutes and showed an absence of DOM interaction, adsorption into or onto the membrane. Moreover the peak shape had a Gaussian profile and, only for the crossflow rate at 3 mL.min<sup>-1</sup>, the fractionation peak is clearly separated from the void peak, thus preventing any fractionation disturbance due to non-separated particles eluting in the void peak. For the standard organic molecule vitamin B12 (1.35kDa), the fractionation peak was clearly separated from the void volume only for the cross flow rate 3 mL.min<sup>-1</sup>. It was therefore efficient to fractionate unknown organic molecules with low molecular weight around 1.3kDa.

According to these results, the optimal crossflow rate was chosen at 3 mL.min<sup>-1</sup>.

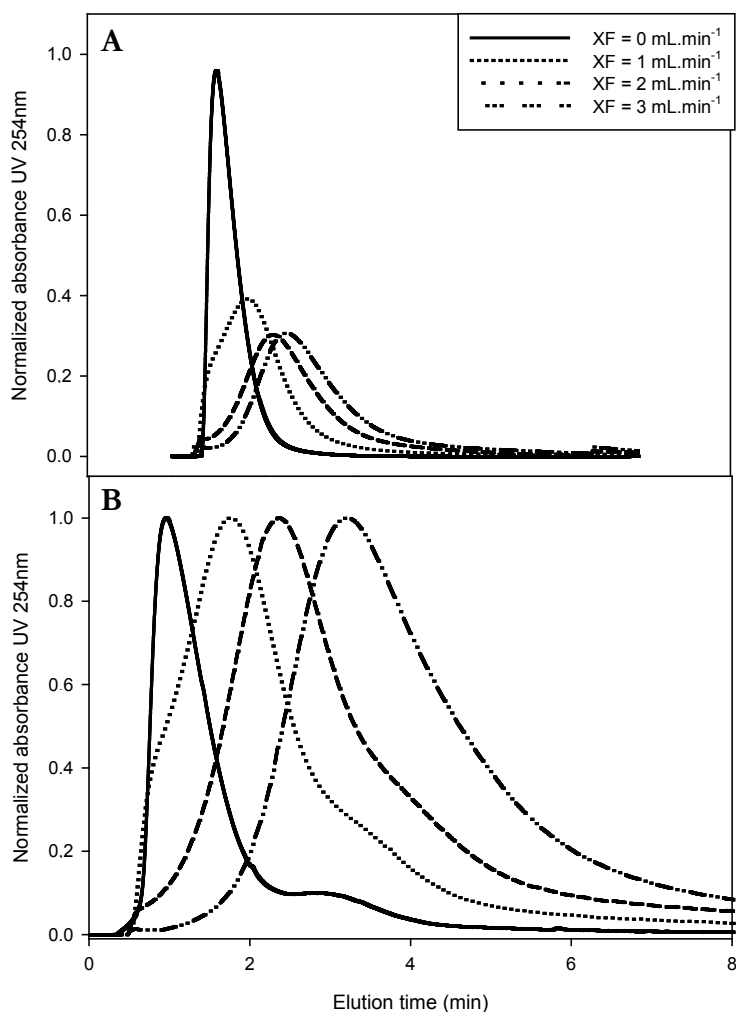


Figure III-4: Fractograms using constant mobile composition (5mM phosphate buffer pH7.2) and four different crossflows: 0, 1, 2 and 3 mL.min<sup>-1</sup>; A: SRFA and B natural samples from river.

As regards the effect of the focus flow time on the separation quality, at least two factors must be taken into consideration, recovery and resolution factor (time between void peak and the first peak). The recoveries of SRFA and PF showed the same trend according to the focus flow time. SRFA recoveries were 97, 99, 84 and 70% and PF recoveries were 108, 109, 94 and 93% respectively for 1, 2, 4 and 8 minutes (Figure III-5). A focus flow time between one and two minutes allowed us to get the best recoveries when after two minutes particles were lost through the membrane. The resolution factor was higher for a focus time of two minutes compared with one minute. According to these results and this study conditions, the optimal focus flow time seemed to be two minutes. As previously showed, the focus flow time can be a powerful parameter in terms of recovery and resolution factors (Gigault et al., 2013). This factor could nevertheless be changed depending on sample characteristics.

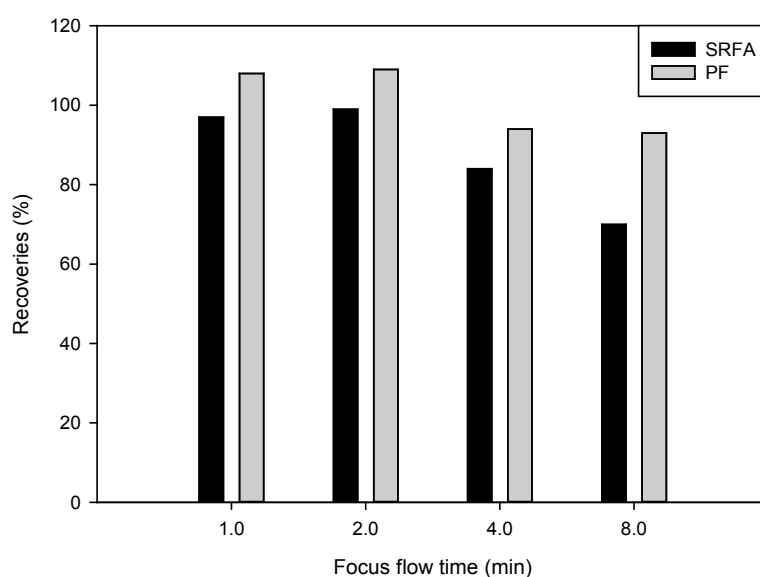


Figure III-5: SRFA and PF recoveries in function of the focus flow time.

## 2 Method validation, performance and efficiency

To evaluate the repeatability, efficiency of the method, five replicates of the calibration curve with the eight standard organic molecules, the two IHSS DOM standards were analyzed and compared using the same conditions (mobile phase: 5mM phosphate buffer, pH 7.2 and constant crossflow rate  $3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , focus flow time 2min, 1kDa PES membrane, spacer  $490\mu\text{m}$  in a short channel) and a new membrane for each run.

This calibration permitted to estimate the variation of the apparent molecular weight according to the retention time and also allowed to verify the linearity of the relationship between MW and retention time along the separation. The linearity was precise ( $r^2$  average = 95%) and significant (RSD = 2%), and confirmed the efficiency and repeatability of the fractionation. A  $r^2$  average of 95% was evaluated as a

good average because of the heterogeneity of the standards used in terms of nature, structure and shape. Using this calibration curve, SRFA molecular weight was estimated. The average SRFA MW was  $1923 \text{ Da} \pm 16\text{Da}$  ( $n=5$ ) in good agreement with previous studies (Guéguen and Cuss, 2011; Guo and Santschi, 1996; Her et al., 2003; O'Loughlin and Chin, 2001). This result confirmed the efficacy of the calibration curve and the determination of the molecular weight in this range of size. The efficiency of the reproducibility was verified by the determination of the PF molecular weight at  $2107 \pm 99\text{Da}$  and the low RSD. The average recoveries with their relative repeatability were  $98\% \pm 5\%$  for SRFA and  $94\% \pm 8\%$  for PF.

According to these results, this type of membrane seemed to have no significant effect on the separation in terms of efficacy, repeatability, efficiency. The optimal conditions for the separation and MW determination of low molecular weight DOM are synthesized in Table III-4.

*Table III-4: Optimized method for separation and characterization of very low molecular weight DOM*

<b>FFF</b>		<b>Carrier solution</b>	
<b>Membrane</b>	1kDa polyether sulfone (Wyatt)	<b>Composition</b>	Phosphate buffer NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>Sample injection</b>	100 - 1000 $\mu$ L	<b>Concentration</b>	5mM
<b>Inject flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	0.2	<b>pH</b>	7.2
<b>Detector flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	1		
<b>Focus flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	2	<b>UV-Vis detector</b>	
<b>Focus time (min)</b>	2	<b>Absorbance (nm)</b>	254
<b>Cross flow (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	3		
<b>Cross-flow time (min)</b>	15		

## V Conclusion

In this study, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation was optimized for low molecular weight dissolved/colloidal organic matter. The chemical characteristics of the mobile phase showed a significant influence on the quality of fractionation, on recoveries and on molecular weight determination. The ionic strength/concentration and nature/type of the mobile phase appeared to be two of the main parameters controlling the separation quality in order to get the best relationship between elution time and molecular weight. The crossflow rate remained one of the key parameters controlling the separation efficiency and especially for the fractionation of the low MW (1 -1.5kDa) molecules.

This work allowed thus to define operating conditions such that a reliable AF4 analysis could be performed on natural particles on the basis of direct comparison of theoretical behavior.

Further applications using these optimized conditions in order to study low molecular weight DOM will lead to relevant information on physico-chemical properties of DOM and much more with hyphenated techniques.

### **Acknowledgement**

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).



Chapitre IV Evaluation de deux méthodes de  
séparation AF4 – application à l'étude de la  
dynamique de la masse moléculaire en estuaire  
de Gironde



Le chapitre précédent a présenté le développement et l'optimisation d'une méthode de séparation et de caractérisation en taille de la MOD naturelle. Cette méthodologie montrant de bonnes performances, elle a été comparée à une autre méthode d'AF4 mise en œuvre avec des conditions opératoires et appareils différents. Ainsi ce chapitre présente la comparaison de ces deux approches pour la séparation de la MOD par fractionnement par couplage flux force avec flux asymétrique associé à un détecteur UV/Visible. L'objectif est de mettre en avant les différences entre la méthode optimisée dans le chapitre précédent à l'aide d'un système Wyatt Technology® (Eclipse 3) et une méthode utilisée depuis quelques années pour l'étude de la dynamique de la MOD (Cuss and Guéguen, 2013, 2015, 2012; Guéguen et al., 2013; Mangal and Guéguen, 2015) à l'aide d'un système Postnova Analytics® (AF2000).

Cette dernière méthode a été mise en œuvre dans le cadre de ce travail pour l'étude de la MOD estuarienne lors d'une mobilité de 4 mois effectuée à l'Université de Trent (Ontario, Canada) dans l'équipe de Céline Guéguen.

## I Matériel et méthodes

### 1 Sites d'études

Cette comparaison a été réalisée sur les échantillons prélevés au cours de la campagne HALOGIR sur l'estuaire de la Gironde (décrit dans le chapitre 2) en septembre 2014 à bord du N/O Côtes de la Manche. Au total 15 échantillons ont été analysés par les deux méthodes (Tableau IV-1).

*Tableau IV-1: Tableau des échantillons*

<b>Nom</b>	<b>Salinité</b>	<b>pH</b>
<b>G 1</b>	2,3	7,99
<b>G 2</b>	2,9	7,8
<b>G 3</b>	3,3	7,87
<b>G 4</b>	3,5	7,7
<b>G 6</b>	4,9	7,99
<b>G 7</b>	6,9	7,95
<b>G 8</b>	7,9	8
<b>G 9</b>	8,2	7,98
<b>G 10</b>	9,8	7,92
<b>G 11</b>	12	8,03
<b>G 13</b>	17,5	8
<b>G 14</b>	24,1	7,98
<b>G 17</b>	32,7	8,1
<b>G 18</b>	32,4	8,86
<b>G 19</b>	32,6	8,24

Ces échantillons ont été prélevés entre le 3 et le 7 septembre 2014 le long de l'estuaire de la Gironde (Figure IV-1). Il est important de prendre en compte la forte variation de salinité entre les points en amont de l'estuaire autour de 2 en salinité et les points les plus en aval et sur la vasière Ouest Gironde avec des salinités autour de 32 (Figure IV-1).

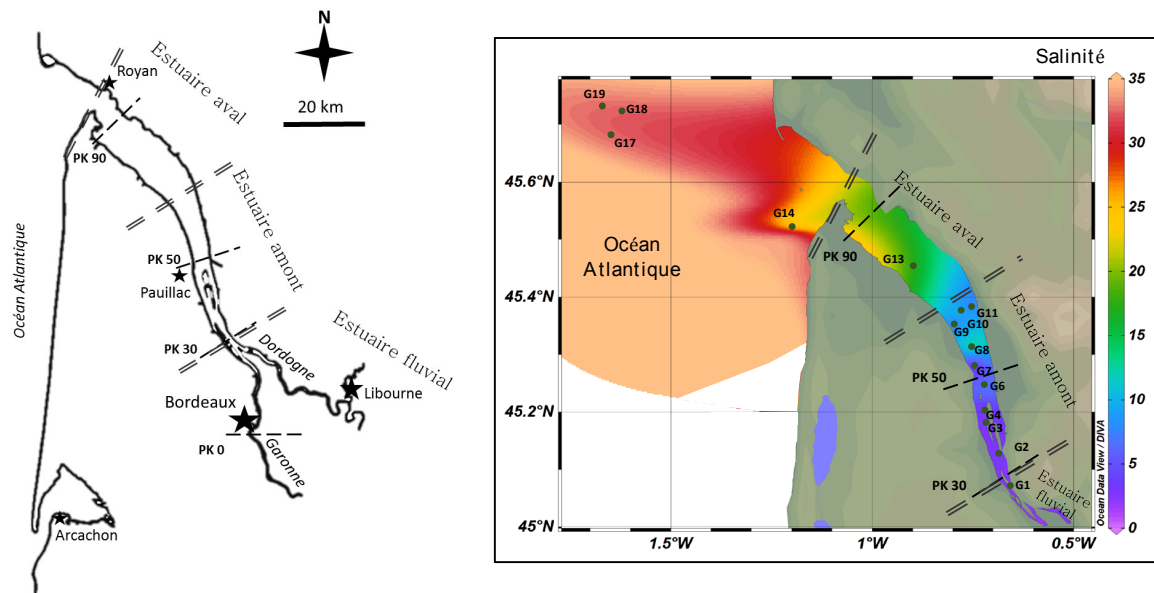


Figure IV-1: Carte de l'estuaire de la Gironde et de la position géographique des échantillons en fonction de la salinité dans l'estuaire au moment du prélèvement

## 2 Analyses des masses moléculaires moyennes par AF4

### *a Système Eclipse 3 de Wyatt Technology*

#### *i Appareillage et méthode*

La description du système Wyatt utilisé est donnée dans le chapitre 2. La méthode utilisée est donc la méthode développée et détaillée dans le chapitre 3 (récapitulatif Tableau IV-2). L'objectif de cette méthode est de fractionner la MOD d'échantillons naturels de façon fiable, reproductible, en essayant de respecter les propriétés physico-chimiques de l'échantillon, tout en travaillant sur la plus large gamme de tailles possible afin de couvrir la plus grande partie de la MOD. De ce fait, la méthode a fait l'objet d'un travail d'optimisation et de développement (détaillé Chapitre 3). De plus, un des buts du développement a été d'optimiser la méthode pour que son application et sa mise en œuvre soient rapides afin de pouvoir travailler sur un grand nombre d'échantillons ayant des propriétés physico-chimiques bien différentes (comme le long d'un gradient de salinité dans un estuaire).

Tableau IV-2: Tableau récapitulatif de la méthode AF4 utilisé avec le système Wyatt

<b>Système AF4 Wyatt</b>	
Membrane	1kDa PES
Volume d'injection	100 - 1000 $\mu$ L
Flux d'injection (mL.min <sup>-1</sup> )	0.2
Flux principal (mL.min <sup>-1</sup> )	1
Flux de focus (mL.min <sup>-1</sup> )	2
Temps de focus (min)	5 (injection +focus) + 2 (focus)
Cross-flow (mL.min <sup>-1</sup> )	3
Temps de cross-flow (min)	10
<b>Phase mobile</b>	
Composition	Tampon phosphate NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Concentration	5mM
pH	7.2
<b>Détecteur UV-Vis</b>	
Longueur d'onde d'absorbance (nm)	254

## ii Courbe de calibration et étalons

Comme détaillé dans le chapitre 3, la courbe de calibration est obtenue à l'aide de 8 étalons de taille et de nature bien distinctes permettant de couvrir une gamme de taille allant de 1,35 kDa à 66 kDa (Tableau IV-3). Ces molécules ont fait l'objet d'un développement spécifique afin d'avoir un comportement fiable dans les conditions de séparation (flux et phase mobile).

Tableau IV-3: Tableau récapitulatif des étalons utilisés afin de réaliser la courbe de calibration pour la méthode utilisant le Système Eclipse 3 de Wyatt Technology

Nom	Code	Masse moléculaire (Da)	Coefficient de diffusion (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
Vitamin B12	Vit B12	1350	1.7 x 10 <sup>-10</sup>
Aprotinine de poumon de bovin	APRO	6500	2.54 x 10 <sup>-10</sup>
Cytochrome C de coeur de bovin	CC	12400	1.3 x 10 <sup>-10</sup>
Lysozyme muramidase de blanc d'œuf de poule	LYS	14300	1.04 x 10 <sup>-10</sup>
Myoglobine de cœur de cheval	MYO	17000	1.03 x 10 <sup>-10</sup>
Anhydrase carbonique d'érythrocytes de bovin	CA	29000	1.14 x 10 <sup>-11</sup>
Albumine de blanc d'oeuf de poule	ALB	44287	7.76 x 10 <sup>-11</sup>
Albumine de sérum bovin, monomère	BSA	66500	6.15 x 10 <sup>-11</sup>

Ainsi le fractionnement et l'analyse de ces 8 étalons injectés séparément avec la méthode décrite ci-dessus permet de tracer une courbe de calibration comme celle donnée Figure IV-2.

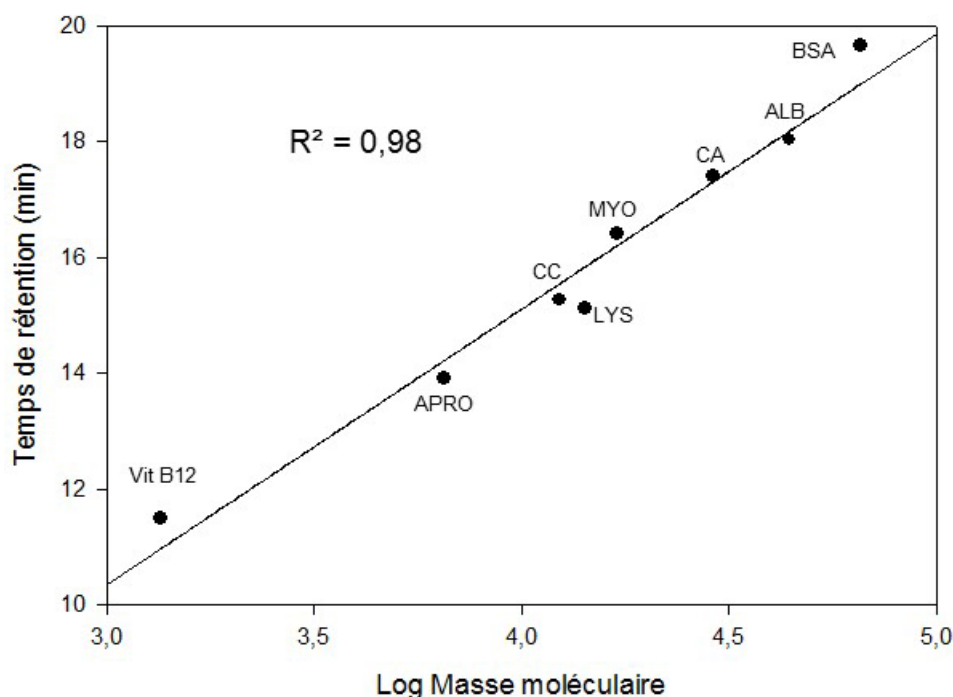


Figure IV-2: Exemple de courbe de calibration avec la position des 8 étalons pour le système Eclipse 3 de Wyatt Technology

Les courbes de calibration ont été effectuées deux fois par jour et lorsque la phase mobile était renouvelée. Pour chaque courbe de calibration, deux standards de MOD (SRFA et PF de l'IHSS) ont été analysés afin de vérifier et valider la qualité de la séparation par l'obtention d'une masse moléculaire conforme pour ces deux étalons. De plus, cela a permis de vérifier qu'il n'y avait pas de différences inter-journalière et intra-journalière.

A l'aide de l'équation de la courbe de calibration, il a donc été possible de déterminer la masse moléculaire moyenne apparente d'échantillons inconnus. En effet à partir des temps de rétention obtenus par analyse des échantillons, la masse moléculaire apparente (MMA) est déterminée à l'aide de l'Équation 23 comme précédemment décrit dans le chapitre 3.

Équation 23

$$MM = 10^{\left(\frac{t_r - b}{a}\right)}$$

Ainsi pour chaque échantillon, une moyenne de la masse moléculaire apparente est réalisée à l'aide des deux courbes de calibration réalisées de façon journalière permettant de calculer deux masses moléculaires.

Cette méthode de calibration présente les avantages d'être réalisée avec 8 étalons couvrant une large gamme de tailles et avec des caractéristiques physico-chimiques proches des molécules présentes

naturellement dans les eaux. Des tests d'injection en mélange et séparément, des étalons, ont été menés. La technique retenue a été l'injection séparée de ces huit étalons afin d'obtenir une meilleure résolution des pics et de s'affranchir de phénomènes d'interactions inter-étalons. Les injections en mélange ont entraîné des agrégations inter-étalons conduisant à de mauvaises séparations et donc courbes de calibration. De plus l'injection séparée de ces 8 étalons a permis de bien définir les temps de rétention. L'un des objectifs de cette méthode de calibration est de s'assurer de la linéarité de la séparation en fonction de la taille de la MOD et de pouvoir statuer sur la reproductibilité des séparations ainsi que sur la comparaison des masses moléculaires obtenues pour des échantillons bien différents.

## *b Système AF2000 Focus Postnova de Postnova Analytics*

### *i Appareillage*

Le système de fractionnement utilisé est un AF2000 Focus (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) équipé de deux pompes PN1130 HPLC permettant de contrôler les flux de focus et flux principal, une pompe PN1160 pour fixer le flux croisé et un dégazeur PN1175 pour éliminer les potentielles bulles d'air présentes dans la phase mobile avant la pompe. Le canal utilisé est un canal standard de Postnova équipé de membranes de seuil de coupure 300 Da en polyéther sulfone (Postnova Analytics) et d'un espaceur de 490  $\mu\text{m}$ . Les différents flux programmés pendant la séparation sont de 0,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  comme flux principal, 3,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  comme flux de focus et 2,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  en flux croisé pendant 20 minutes. Le volume d'injection est de 0,9 mL mais 2 mL ont été injectés dans une boucle d'injection Rheodyne de 0,9 mL afin de minimiser les effets mémoires dans la boucle (Tableau IV-4). Ce système est couplé à un détecteur à barrette de diodes (DAD) Shimadzu SPD-M20A (DAD) réglé à 254 nm pour l'analyse des échantillons (Guéguen and Cuss, 2011).

Afin de respecter au maximum les échantillons naturels, la phase mobile a été réalisée de façon à avoir les mêmes pH et conductivité que le ou les échantillons à analyser. Ainsi pour chaque phase mobile (conditions de pH et conductivité), une courbe de calibration a été réalisée avant et après la série d'échantillons à analyser. De plus dans le but de s'assurer qu'il n'y avait pas d'effet mémoire du système de séparation et analyse, un blanc a été effectué systématiquement avant chaque analyse d'échantillons, d'étalons ou de standards. Le pH a été ajusté entre 7,5 et 8,5 et la force ionique entre 0,2 et 55  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  à l'aide d'hydroxyde de sodium (NaOH ; Sigma Aldrich) et de chlorure de sodium (NaCl ; Cadelon Laboratories) respectivement.

La méthode de séparation et d'analyse est récapitulée dans le Tableau IV-4.

Tableau IV-4: Tableau récapitulatif de la méthode AF4 utilisé avec le système AF2000 Focus de Postnova Analytics

<b>Système AF4 Postnova</b>	
Membrane	300Da PES
Volume d'injection (mL)	0,9
Flux d'injection (mL.min <sup>-1</sup> )	0,3
Flux principal (mL.min <sup>-1</sup> )	0,4
Flux de focus (mL.min <sup>-1</sup> )	3
Temps de focus (min)	5
Flux croisé (mL.min <sup>-1</sup> )	2,2
Temps de cross-flow (min)	20
<b>Phase mobile</b>	
Composition	NaCl / NaOH
Concentration	Même pH et conductivité que l'échantillon à analyser
pH	
<b>Détecteur à barrette diodes</b>	
Longueur d'ondes (nm)	254 pour les échantillons 270 ; 355 ; 405 ; 550 ; 591 Pour les étalons

L'étude de l'évolution de la masse moléculaire dans l'estuaire à l'aide du système Eclipse 3 de Wyatt Technology a nécessité l'application de deux courbes de calibration (Figure IV-3). Afin de s'affranchir d'un potentiel effet des courbes de calibration utilisées leur comparaison a mis en avant une absence de différences significatives ( $p = 0,933$ ).

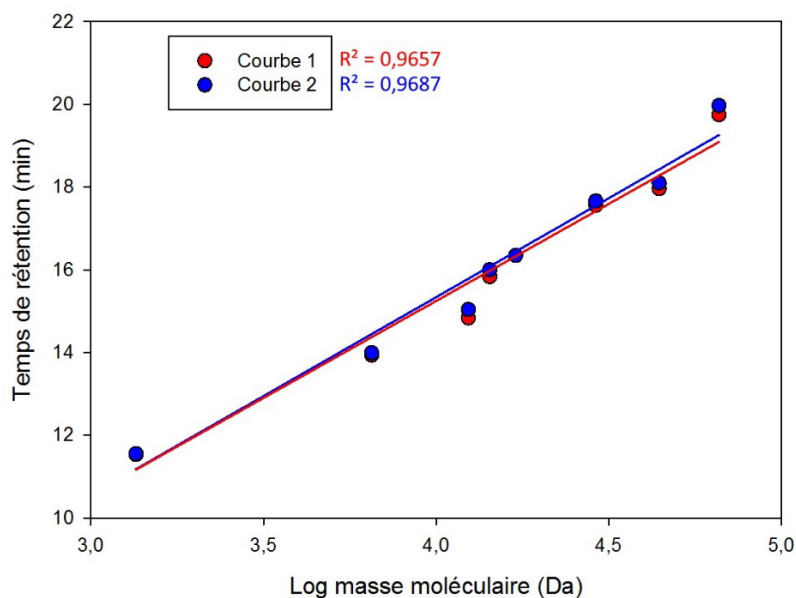


Figure IV-3: Comparaison de deux courbes de calibration utilisées avec le système Postnova Analytics ( $R^2$  des régressions linéaires pour chaque courbe)

Cette méthode a été développée dans le but de respecter au maximum les échantillons en utilisant des conditions de séparation les plus proches possibles des propriétés physico-chimiques des échantillons en termes de pH et de force ionique. Elle a ainsi l'avantage de s'affranchir de l'effet de la phase mobile sur les particules présentes dans l'échantillon. Cependant la mise en œuvre de cette méthode est longue en raison des changements de phase mobile nécessaires pour chaque condition de pH et salinité des échantillons à analyser.

## ii Courbe de calibration et étalons

Les courbes de calibration ont été réalisées à l'aide de 5 étalons (rhodamine B (479 Da; Acros Organics), Bromophénol blue (692 Da; Sigma–Aldrich), vitamine B12 (1330 Da; Sigma–Aldrich), cytochrome C de cœur de bovin (12,400 Da; Sigma–Aldrich), lysozyme de blanc d'œuf de poule (14,000 Da; Fluka)) injectés en mélange. Ces étalons permettent de couvrir une gamme de tailles comprises entre 14kDa et 479Da. Les propriétés de ces étalons et l'utilisation des détecteurs à barrette de diodes (multi-longueurs d'onde) ont permis une injection en mélange tout en conservant une bonne résolution et sans entraîner des phénomènes d'interaction inter-étalons. De ce fait le détecteur a été réglé aux longueurs spécifiques de chaque étalon (Tableau IV-5).

Tableau IV-5: Tableau récapitulatif des étalons utilisés afin de réaliser la courbe de calibration pour la méthode Postnova

Nom	Code	Masse moléculaire (Da)	Coefficient de diffusion (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Longueur d'onde (nm)
Rhodamine B	RB	479	-	550
Bromophénol blue	BB	692	-	591
Vitamine B12	Vit B12	1350	1.7 x 10 <sup>-10</sup>	355
Cytochrome C from bovine heart	CC	12400	1.3 x 10 <sup>-10</sup>	405
Lysozyme muramidase from hen egg white	LYS	14300	1.04 x 10 <sup>-10</sup>	270

Ainsi l'injection de ces 5 étalons en mélange a permis de tracer des courbes de calibration du temps de rétention des étalons en fonction du logarithme de leur masse moléculaire. A l'aide de ces courbes de calibration (Figure IV-4), il a été possible de vérifier et valider le système de séparation (dans le cas où le coefficient de détermination  $r^2$  de la courbe était supérieur à 0,95) et ensuite de calculer une masse moléculaire apparente pour les échantillons de MOD.

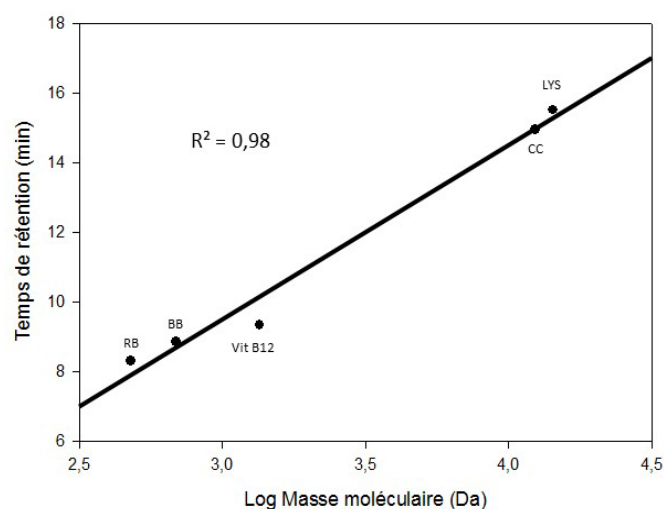


Figure IV-4: Exemple de courbe de calibration avec la position des 5 étalons pour le système AF2000 Focus de Postnova Analytics

De la même façon que pour le système Wyatt, à partir des équations des courbes de calibration il a donc été possible de déterminer les masses moléculaires moyennes apparentes pour les échantillons naturels de taille inconnue. A l'aide des deux courbes de calibration réalisées chaque jour comme pour le système Wyatt, une moyenne des masses moléculaires apparentes a été effectuée.

Pour chaque condition physico-chimique des échantillons (pH et force ionique), une courbe de calibration a ainsi dû être réalisée. Comme le montre la Figure IV-5, les conditions de séparation, forces



ioniques de la phase mobile, influencent directement la courbe de calibration. L'augmentation de la force ionique (salinité) dans la phase mobile entraîne un accroissement du temps de rétention des étalons, notamment bien visible sur ceux aux plus grandes masses moléculaires, Cytochrome C et Lysozyme (Figure IV-5).

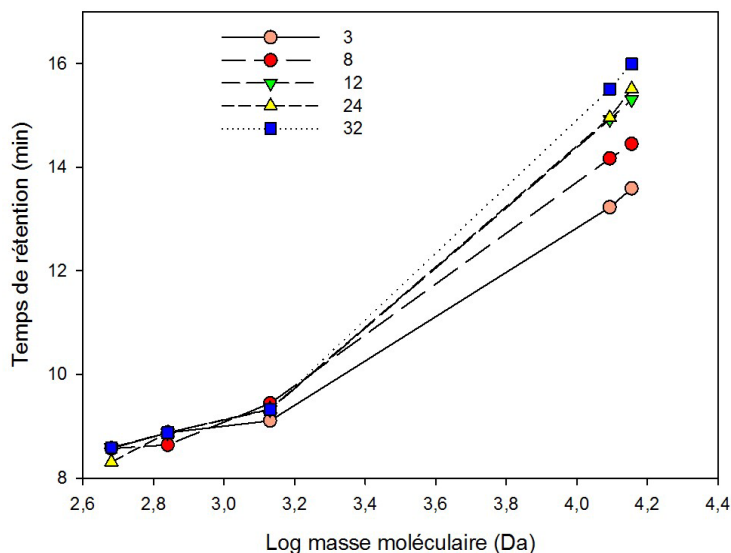


Figure IV-5 : Cinq courbes de calibration tracées pour 5 salinités différentes (3 ; 8 ; 12 ; 24 ; 32) à l'aide des 5 étalons

L'objectif de cette méthode de calibration à l'aide de 5 étalons est de pouvoir calculer une masse moléculaire moyenne apparente pour des échantillons naturels pour un intervalle de tailles bien défini c'est-à-dire en s'intéressant à la MOD de plutôt faible poids moléculaire.

### 3 Mise en avant des différences, avantages et inconvénients

La comparaison des deux méthodes d'analyse avec les systèmes Wyatt et Postnova met en avant des différences notables en termes de phase mobile (composition et force ionique), de flux et de méthodes de calibration.

L'avantage principal que l'on peut noter pour la méthode Wyatt réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire de changer de phase mobile pour une même série d'échantillons même pour des échantillons avec des caractéristiques physico-chimiques bien différentes. Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence la robustesse et la fiabilité de cette méthode dans ces conditions et pour des échantillons bien distincts. L'utilisation d'un tampon comme phase mobile présente des avantages dans le respect des échantillons.

Les conditions d'analyse avec le système Postnova permettent de s'assurer que les conditions de séparation en termes de composition, force ionique et pH ne devraient pas modifier les propriétés des

particules des échantillons. Cependant cette méthode présente un inconvénient majeur qui est le temps de sa mise en œuvre, étant donné que la phase mobile doit être changée pour chaque changement de caractéristiques physico-chimiques des échantillons. De plus, les courbes de calibration doivent être refaites pour chacune de ces nouvelles conditions. Ainsi pour le même jeu d'échantillons, le temps d'analyse peut être significativement différent entre ces deux méthodes.

D'un autre point de vue, la méthode développée avec le système Postnova présente un avantage non négligeable qui est le seuil de coupure de la membrane de 300 Da contre 1 kDa pour le système Wyatt. Ainsi l'utilisation de membranes de bas seuil de coupure permet d'étudier une plus grande gamme de taille notamment dans un ordre de grandeur encore mal connu aujourd'hui.

La comparaison des courbes de calibration obtenues ne montre pas de différences notables hormis dans le nombre d'étalons employés et le fait que la gamme de tailles pour la méthode Wyatt s'étend vers les plus grandes masses moléculaires. Dans les deux cas, l'utilisation d'étalons organiques et non pas de billes sphériques de plastique synthétique dénote la volonté de travailler avec des molécules plus proches des réalités environnementales. Cependant un des avantages de la méthode Postnova pour la courbe de calibration repose sur le fait que les étalons sont injectés en mélange. En effet le gain de temps est non négligeable, mais il apparaît primordial de vérifier les potentiels effets d'interaction inter-étalons. De plus, l'injection de standards en mélange nécessite l'utilisation d'un détecteur multi-longueurs d'onde (DAD) afin d'enregistrer au maximum d'absorption de chacun des standards. Cependant la superposition des signaux d'absorbance sur les spectres peut entraîner des complications d'interprétation pour définir les temps de rétention pour chaque étalon.

## II Détermination de la taille moléculaire de la MOD par deux techniques AF4 dans l'estuaire de la Gironde

### *a Masse moléculaire de la MOD le long de l'estuaire de la Gironde*

Les deux techniques ont permis de discerner les masses moléculaires des 15 échantillons et montrent des différences significatives dans l'évolution des tailles (Tableau IV-6 ). Cependant, la comparaison des tailles moyennes met en avant des différences importantes entre les deux techniques ( $p < 0,001$ ), la méthode Postnova donnant une moyenne pour les 15 échantillons de  $1317 \pm 148$  Da alors que la méthode Wyatt donne une moyenne de  $1718 \pm 81$  Da. Ces différences sont en cohérence avec la différence de seuil de coupure des membranes utilisées pour chaque méthode.

Tableau IV-6: Masse moléculaire obtenue à partir des deux courbes de calibration pour les deux méthodes et statistiques descriptives

<b>Masse moléculaire moyenne</b>							
	<b>Wyatt</b>			<b>Postnova</b>			
<b>Nom code</b>	<b>Calibration 1</b>	<b>Calibration 2</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Calibration 1</b>	<b>Calibration 2</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Variation</b>
<b>G1</b>	1858	1835	<b>1847</b>	1381	1426	<b>1403</b>	443
<b>G2</b>	1873	1850	<b>1862</b>	1459	1509	<b>1484</b>	378
<b>G3</b>	1798	1777	<b>1787</b>	1426	1473	<b>1450</b>	338
<b>G4</b>	1828	1806	<b>1817</b>	1279	1317	<b>1298</b>	519
<b>G6</b>	1768	1748	<b>1758</b>	1331	1360	<b>1345</b>	413
<b>G7</b>	1754	1734	<b>1744</b>	1313	1342	<b>1327</b>	416
<b>G8</b>	1725	1706	<b>1716</b>	1412	1490	<b>1451</b>	265
<b>G9</b>	1739	1720	<b>1730</b>	1249	1164	<b>1207</b>	523
<b>G10</b>	1711	1693	<b>1702</b>	1256	1318	<b>1287</b>	415
<b>G11</b>	1655	1639	<b>1647</b>	1535	1484	<b>1509</b>	137
<b>G13</b>	1642	1625	<b>1633</b>	1462	1524	<b>1493</b>	140
<b>G14</b>	1642	1625	<b>1633</b>	1249	1200	<b>1225</b>	409
<b>G17</b>	1642	1625	<b>1633</b>	1079	1063	<b>1071</b>	562
<b>G18</b>	1655	1639	<b>1647</b>	1091	1057	<b>1074</b>	573
<b>G19</b>	1628	1612	<b>1620</b>	1159	1129	<b>1144</b>	476
<b>Moyenne</b>	<b>1718</b>			<b>1317</b>			
<b>Ecart-type</b>	<b>81</b>			<b>148</b>			
<b>Erreur-type</b>	<b>14</b>			<b>27</b>			
<b>Médiane</b>	<b>1715</b>			<b>1324</b>			
<b>Minimum</b>	<b>1612</b>			<b>1057</b>			
<b>Maximum</b>	<b>1873</b>			<b>1535</b>			
<b>Quartile 25 %</b>	<b>1640</b>			<b>1191</b>			
<b>Quartile 75 %</b>	<b>1782</b>			<b>1459</b>			
<b>Comparaison des calibrations</b>							
Test de normalité Shapiro-Wilk	Rejeté (P < 0,05)			Accepté (P = 0,107)			
Test t	Pas de différence significative (p = 0,3)			Pas de différence significative (p = 0,418)			

Les deux méthodes permettent néanmoins d'étudier l'évolution de la masse moléculaire de la MOD en milieu aquatique naturel. Il est cependant nécessaire de bien prendre en considération dans l'interprétation des résultats les spécificités des méthodes utilisées. En effet les différences mises en avant par cette comparaison indiquent que le choix de la méthode développée a une grande influence sur les résultats obtenus. Cependant pour les deux méthodes, les masses moléculaires de la MOD

présentent une tendance à la diminution de l'amont vers l'aval de l'estuaire à mesure que la salinité augmente.

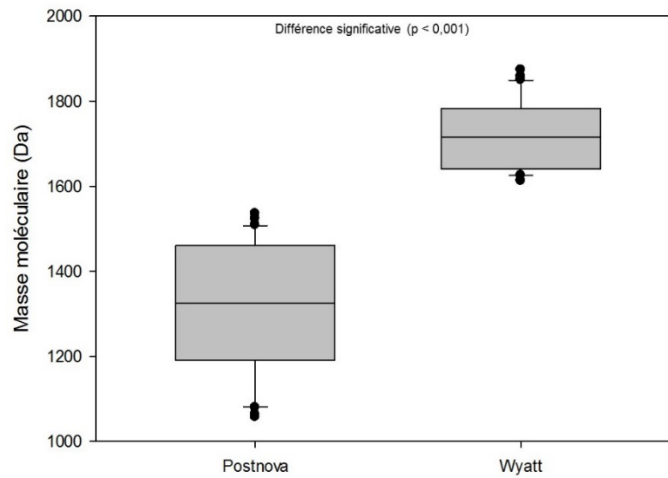


Figure IV-6: Comparaison des résultats de masses moléculaires par les deux techniques présentant des différences significatives (Mann-Whitney;  $p < 0,001$ )

### *b* Masse moléculaire apparente déterminé par le système Postnova

La détermination de la masse moléculaire à l'aide de la technique utilisant le système Postnova permet d'obtenir des masses moléculaires moyennes comprises entre 1057 et 1535 Da avec une moyenne de 1317 Da et une médiane de 1324 Da (Tableau IV-6). La tendance globale est à une diminution de la taille de la MOD le long de l'estuaire de l'amont vers l'embouchure (Figure IV-7).

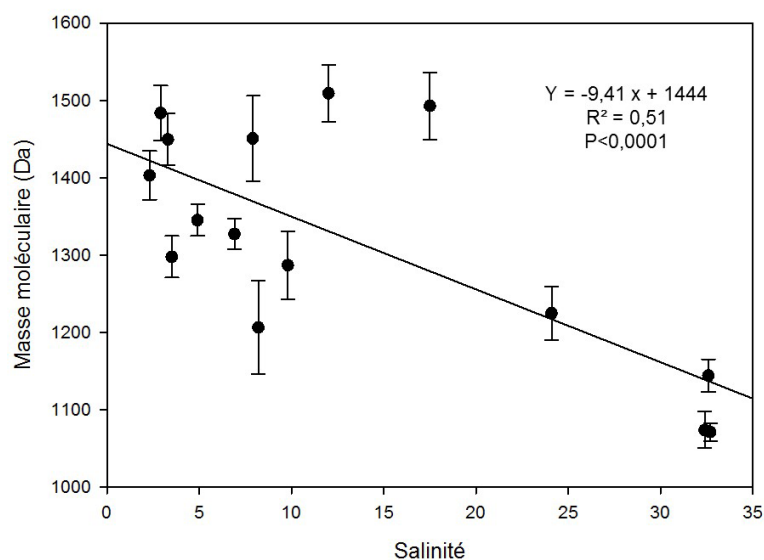


Figure IV-7: Distribution des masses moléculaires moyennes apparentes des échantillons de MOD de l'estuaire de la Gironde à l'aide de la méthode développée sur le système Postnova et la régression linéaire associée

Cependant, il apparaît possible de découper cette distribution de la masse moléculaire dans l'estuaire de la Gironde à l'aide du système Postnova en deux parties (Figure IV-8), l'amont d'un côté et l'aval-côtier de l'estuaire de l'autre. Dans la partie amont de l'estuaire où la salinité oscille entre 2 et 18, les variations de masses moléculaires sont de l'ordre de 300 Da pour 11 échantillons (Figure IV-8). Cette zone est donc caractérisée par une forte oscillation de la masse moléculaire moyenne dans des salinités spécifiques par exemple la valeur de masse moléculaire la plus faible, 1207 Da, apparaît pour une salinité de 8. A cette même salinité (environ 8), trois échantillons G8, G9, G10 (Figure IV-1) avec des masses moléculaires respectives de l'ordre de 1451, 1207 et 1287 Da présentent des différences significatives. Ainsi il est possible de bien discriminer des masses moléculaires proches dans des échantillons ayant des propriétés physico-chimiques semblables. Dans cette partie de l'estuaire, deux zones se démarquent de par la diminution de la masse moléculaire de la MOD, c'est-à-dire autour des salinités 4-5 et ensuite entre 8 et 10. Ces zones ont déjà été ciblées comme étant préférentielles pour le développement du bouchon vaseux (Asmala et al., 2014) et sa mobilité entre Portets (PK40) et Pauillac (PK50) dans le cas de la Gironde selon les débits fluviaux (Jalón-Rojas et al., 2015).

En réalité les échantillons de G17 à G19 ne sont pas réellement situés dans la partie aval de l'estuaire mais plutôt en zone côtière sous influence de l'estuaire. La salinité des 3 échantillons prélevés dans cette zone est autour de 32, les variations des masses moléculaires sont les plus faibles avec une différence de minimum-maximum autour de 154 Da (Figure IV-8) et une moyenne de 1096 Da. La caractérisation de leur masse moléculaire en comparaison avec le continuum le long de l'estuaire montre des différences significatives très fortes ( $p < 0,001$ ).

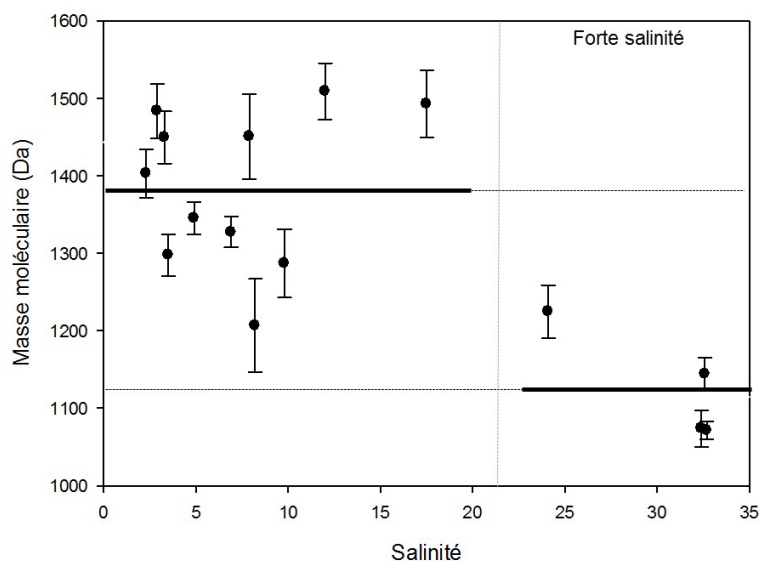


Figure IV-8: Discrimination de la distribution en masses moléculaires de la MOD dans l'estuaire de la Gironde à partir du système AF2000 Focus de Postnova Analytics

La distribution en masses moléculaires de la MOD le long de l'estuaire à partir de cette méthode permet de partager cette série en deux parties bien distinctes en termes de tailles. Dans l'estuaire amont la moyenne de la masse moléculaire est de 1376 Da (n= 20) avec un écart-type de 100 Da (Figure IV-8), alors que dans l'estuaire aval et dans la zone côtière, la moyenne de la masse moléculaire est de 1128 Da (n=8) et l'écart-type de 69 Da. Ainsi la comparaison de ces deux groupes montre des différences significatives ( $p < 0,0001$ ).

La méthode de séparation sur le système AF2000 Focus de Postnova Analytics qui utilise une membrane de 300 Da et des phases mobiles aux caractéristiques physico-chimiques les plus proches possibles de celle des échantillons (pH et force ionique) a donc permis de déterminer la masse moléculaire de la MOD en milieu estuarien. Ainsi la distribution de la masse moléculaire le long de l'estuaire de la Gironde a permis de mettre en avant une évolution marquée, notamment dans des zones spécifiques de l'estuaire. La méthode présente donc une sensibilité suffisamment forte pour étudier des échantillons environnementaux. La moyenne des écart-types des deux masses moléculaires obtenues à l'aide des deux courbes de calibration est de 33 Da ce qui indique une méthode fiable et reproductible.

Cette méthode s'est donc avérée robuste et suffisamment sensible pour étudier la distribution de la masse moléculaire de la MOD dans un estuaire et permettre d'en tirer des conclusions environnementales.

### *c Masse moléculaire apparente déterminé par le système Eclipse*

#### *3 de Wyatt Technology*

La détermination de la masse moléculaire à l'aide du système Eclipse 3 de Wyatt Technology a permis de déterminer une distribution de masses moléculaires moyennes de la MOD dans l'estuaire de la Gironde avec une moyenne de 1718 Da, un écart-type de 81 Da et des minima-maxima à 1612 et 1873 Da (Tableau IV-6). Cette méthode a donc également permis d'étudier l'évolution de la MOD en milieu naturel. Ainsi la tendance globale observée est à nouveau une diminution de la taille de la MOD d'amont en aval de l'estuaire de la Gironde (Figure IV-9).

En tout premier lieu, l'application de cette méthode a mis en avant des différences de masses moléculaires entre les échantillons avec des extrêmes au niveau des plus basses salinités, en amont de l'estuaire, et des plus fortes salinités, en aval de l'estuaire voir même en sortie de l'estuaire (Figure IV-9).

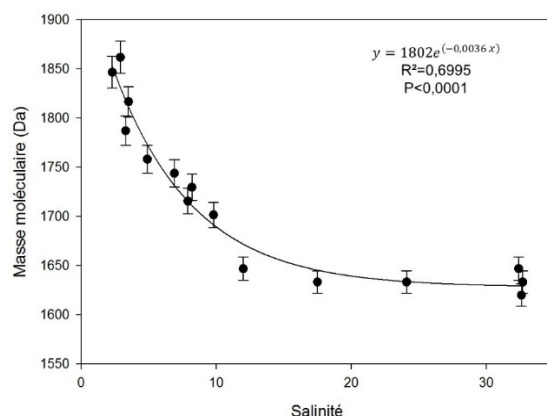


Figure IV-9: Distribution des masses moléculaires moyennes apparentes des échantillons de MOD de l'estuaire de la Gironde calculées à l'aide de la méthode Wyatt et la régression linéaire associée

Le calcul de la régression linéaire a montré une tendance à la décroissance exponentielle (de premier ordre) de la taille de la MOD avec l'augmentation de la salinité.

Il est possible, d'autre part, de partager en deux parties la distribution des MMA de la MOD dans l'estuaire. Ainsi pour des salinités comprises entre 2 et 15, c'est-à-dire dans l'estuaire amont, l'évolution de la taille de la MOD est très rapide (Figure IV-10) avec une moyenne de 1760 Da et un écart entre minimum et maximum de 235 Da. Dans cette partie, la décroissance de la masse moléculaire de la MOD est linéaire et forte (coefficient directeur de -19,67) et présente de faibles variations ( $R^2=0,8937$  ;  $p<0,0001$ ).

La deuxième partie est constituée de l'estuaire aval et de la zone côtière où les salinités oscillent d'environ 15 à 33. Dans cette zone, l'évolution de la masse moléculaire est très faible, la moyenne étant de 1633 Da et la différence entre le minimum et le maximum de 43 Da. La régression linéaire de cette partie indique bien que l'évolution de la taille est très faible (coefficient directeur de -0,0345). Il n'y a donc pas de différences significatives entre les échantillons de zones côtières (G17, G18, G19) et les échantillons dans l'estuaire aval en termes de masses moléculaires.

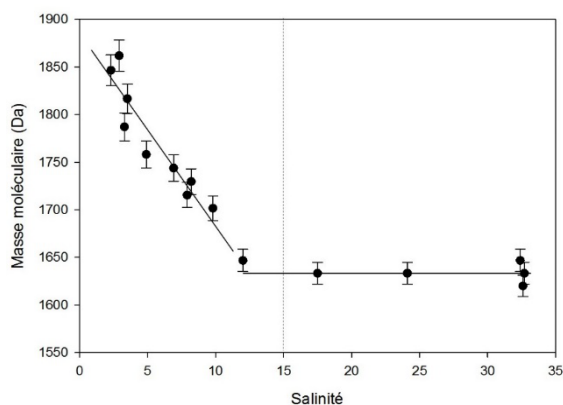


Figure IV-10: Séparation en deux parties de la distribution en masses moléculaires de la MOD dans l'estuaire de la Gironde à partir de la méthode Wyatt

La comparaison de ces deux zones de l'estuaire présente des différences significatives marquées ( $p < 0,001$ ) entre les distributions des masses moléculaires. Cette tendance met en avant des processus d'évolution différents selon la position dans l'estuaire.

La méthode de séparation du système AF4 Wyatt, qui utilise des membranes de seuil de coupure de 1 kDa et une phase mobile composée de tampon phosphate (5 mM à pH 7,2), permet de caractériser la masse moléculaire de la MOD en milieu estuarien. La distribution des masses moléculaires de la MOD le long de l'estuaire de la Gironde a ainsi permis de mettre en avant une évolution exponentielle décroissante de l'estuaire amont vers la zone côtière. Cette méthode présente une sensibilité assez forte et une robustesse permettant d'étudier des échantillons environnementaux. La moyenne des écart-types obtenus par le calcul des masses moléculaires à l'aide des deux courbes de calibration est relativement faible (autour de 13 Da). Cette méthode est donc fiable et suffisamment sensible pour étudier la distribution de la masse moléculaire de la MOD dans un estuaire et permet de mieux comprendre et d'appréhender la dynamique et l'évolution de la MOD.

#### *d Comparaison, avantages et inconvénients*

Les deux méthodes de séparation AF4, optimisées avec les systèmes Postnova et Wyatt, ont donc permis d'étudier la distribution de la masse moléculaire de la MOD dans les milieux aquatiques naturels et notamment dans des gradients de salinité. Cependant les résultats obtenus montrent de réelles différences en termes de masses moléculaires calculées mais aussi de tendances le long de l'estuaire. Bien que ces deux méthodes n'amènent pas aux mêmes résultats, les conclusions générales restent dans les deux cas une décroissance de la masse moléculaire de la MOD le long du gradient de salinité dans l'estuaire de la Gironde.

Tout d'abord, comme dit précédemment, il existe des différences significatives (Figure IV-6) entre les deux séries de résultats obtenus. Les conditions analytiques de séparation pour chacune des deux méthodes et les propriétés physico-chimiques des échantillons peuvent évidemment avoir des influences sur les résultats. Une analyse statistique a été réalisée pour étudier l'effet de la méthode utilisée et de la salinité sur les résultats obtenus. La salinité des échantillons et la méthode, considérées individuellement, influencent significativement la distribution de la masse moléculaire ( $p < 0,0001$ ). Cependant il n'y a pas d'interaction entre la méthode et la salinité ( $p = 0,2186$ ) sur la mesure de la masse moléculaire (pas d'effet combiné méthode – salinité). Dans le cas où il y aurait eu un tel effet méthode-salinité sur la mesure de la masse moléculaire, le choix de la méthode Postnova pour une salinité donnée aurait été obligatoire. Chacune des méthodes reste donc valable et robuste pour étudier la distribution de la masse moléculaire.



Ces différences mettent très clairement en avant l'influence des spécificités de ces deux méthodes d'analyse par AF4 sur les résultats obtenus. Tout d'abord les instruments AF4 Postnova Analytics équipés d'une membrane de 300 Da ont été largement utilisés (Cuss and Guéguen, 2015, 2012; Guéguen and Cuss, 2011; Mangal and Guéguen, 2015; Pifer et al., 2011; Stolpe et al., 2010a) et permettent d'étudier les molécules les plus petites de la MOD. La différence de 700 Da entre les seuils de coupure des deux membranes, 300Da et 1kDa, entraine forcément des résultats différents de masses moléculaires moyennes de la MOD dans l'environnement. L'utilisation de la membrane à 300 Da permet donc une étude plus fine de la MOD notamment pour les molécules à très faible masse moléculaire. Les membranes de 1 kDa, très largement utilisées également (Alasonati et al., 2010; Lyvén et al., 2003; Stolpe et al., 2014, 2013; Thang et al., 2001), permettent une étude plus globale mais sous-estimant les molécules de très faible masse moléculaire.

### i Préparation des échantillons

L'AF4 est une technique permettant un fractionnement des macromolécules en suspension dans une gamme de tailles allant de 1 nm à plus de 1  $\mu\text{m}$  et sur une large gamme de pH et des forces ioniques. Cependant dans les environnements aquatiques naturels, les macromolécules ou colloïdes sont souvent associés à des matrices complexes, pouvant nécessiter une préparation des échantillons.

Un des avantages de l'AF4 est que cette technique ne nécessite pas de préparation préalable des échantillons, hormis bien sûr une étape de filtration afin de séparer la MO particulaire de la MO colloïdale/dissoute. Cette technique permet de s'affranchir de potentielles étapes d'extraction et/ou de concentration pouvant entrainer en plus d'une perte de temps non négligeable, des pertes et modification du matériel organique au cours des processus.

L'étape de focus au cours de l'analyse AF4 constitue un mode de concentration directement en tête de canal intégré à l'étape d'injection des échantillons. Outre le fait de permettre une injection d'échantillons en quantité plus importante, l'utilisation du même flux transversal au cours des étapes de focus et d'élution entraine un meilleur équilibre entre les flux croisés et la stabilité des molécules au cours de la séparation.

### ii Membrane, seuil de coupure

Les seuils de coupure utilisés dans les deux systèmes sont les plus petits couramment employés pour ces systèmes c'est-à-dire 1 kDa pour Wyatt Technology et 300 Da pour Postnova Analytics. L'utilisation des seuils de coupure les plus bas possibles permet d'étudier plus finement la MOD dans l'environnement et notamment de prendre en compte les molécules issues des processus de

dégradation. Il est cependant, à l'heure actuelle, impossible d'utiliser les membranes de seuil de coupure de 300 Da sur le système Wyatt Technology en raison des propriétés du module qui gère les différents flux. Des tests de membranes de seuil de coupure de 650Da ont été initiés dans le cadre de ces travaux de thèse sur le système Wyatt Technology mais en raison de problèmes de stabilisation des flux et des pressions dans le canal et faute de temps pour optimiser leur utilisation, celle-ci n'a pas été possible.

Ce type d'étude amène donc des complexités analytiques en raison du très faible seuil de coupure des membranes nécessaire engendrant de fortes pressions dans le canal et dans l'ensemble du système analytique. De ce fait, l'utilisation de ces bas seuils de coupure nécessite de diminuer donc le flux croisé afin de conserver une pression correcte dans le canal. Les deux méthodes, décrites précédemment et utilisées dans ce travail, s'opposent donc aussi par les flux utilisés en raison des caractéristiques techniques propres à chaque instrument. La différence de pression engendrée par les seuils de coupure des membranes a conduit à optimiser les flux en conséquence pour chaque appareil. Pour la méthode Postnova le seuil de coupure des membranes est plus bas ce qui se traduit par de plus fortes pressions dans le canal et le système malgré des flux principaux d'élution et croisé avec de plus faibles débits que pour le système Wyatt. L'utilisation d'un flux croisé plus faible peut entraîner un amoindrissement de la qualité de la séparation. Dans le cas de l'injection des étalons ceci se traduit par un rapprochement des pics (Figure IV-11). Dans le cas des échantillons naturels il est possible d'avoir un rapprochement non négligeable du pic de solvant avec le premier pic de MOD ; la séparation de ces deux pics est très importante en AF4 car elle va conditionner la qualité de l'analyse. La Figure IV-11 montre bien l'effet de la diminution du flux croisé sur la séparation entre le pic de solvant et le pic d'analyse, plus le flux croisé diminue plus les pics se rapprochent.

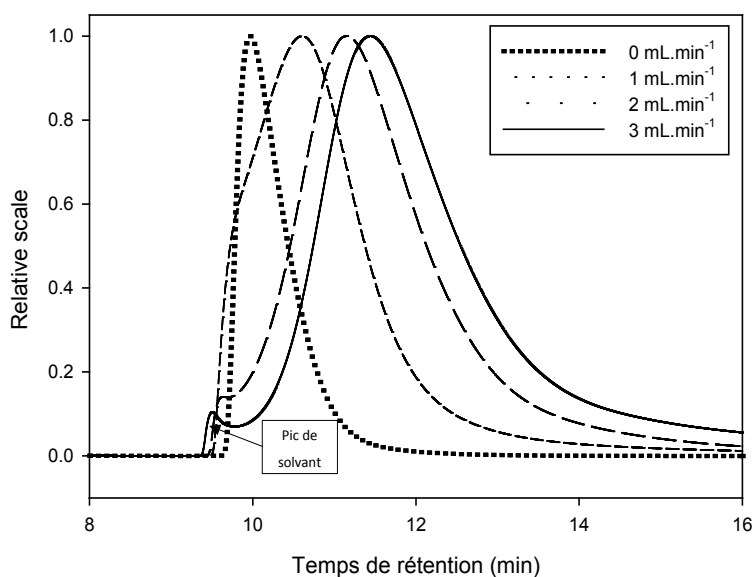


Figure IV-11: Représentation de l'effet du flux croisé sur la séparation du pic de solvant avec le pic d'analyse de SRFA

Dans la méthode optimisée avec le système Wyatt Technology, l'utilisation de la membrane de 1 kDa permet l'utilisation de débits pour les flux croisé et d'élution optimaux en termes de rapidité et d'efficacité d'analyse malgré la perte des plus petites molécules de MOD (inférieure à 1 kDa). Cette notion de perte est étudiée à l'aide des taux de recouvrement qui permet d'estimer le pourcentage de perte au cours de l'application d'une méthode dans le but de pouvoir quantifier la représentativité de l'analyse. Comme discuté dans le chapitre précédent, la méthode Wyatt optimisée permet néanmoins d'obtenir des taux de recouvrement très satisfaisants pour l'étude de la MOD naturelle (taux de recouvrement moyen de  $98\% \pm 5\%$  et  $94\% \pm 8\%$  pour respectivement SRFA et PF (n=5)).

### iii Phase mobile

Les deux méthodes d'analyse de la MOD par AF4 qui ont été mises en œuvre dans cette étude utilisent des phases mobiles différentes en raison d'objectifs différents. Les choix de phases mobiles effectués dans le cas de Postnova visaient à respecter au maximum l'échantillon et les molécules en conservant les mêmes conditions physico-chimiques (pH et salinité) alors que dans le cas de la méthode optimisée avec le système Wyatt l'objectif était d'utiliser une même phase mobile pour l'ensemble des analyses permettant ainsi d'avoir des résultats comparables pour un même jeu d'échantillons tout en respectant l'échantillon au maximum. Les plus grandes différences observées ont été d'un point de vue temporel et analytique car la méthode Postnova nécessitait de changer de phase mobile pour chaque échantillon (propriétés physico-chimiques différentes) et donc de faire autant de courbes de calibration que de conditions de salinité et pH. Ces phases de changement de phase mobile et de nouvelles calibrations entraînent un coût temporel non négligeable dans l'analyse de larges séries d'échantillons environnementaux avec des propriétés différentes comme dans un estuaire. De plus l'analyse d'échantillons à fortes salinités (d'origine estuarienne ou marine) peut engendrer des complexités analytiques par accumulation de cristaux de sel dans le système ce qui amène à réaliser des séries de blancs entre les échantillons afin de s'en affranchir. Il est d'autre part nécessaire de s'assurer de la bonne qualité de la séparation (linéarité, reproductibilité) en raison de l'effet électrochimique d'une forte concentration en sels sur les membranes. Dans le cas de la méthode optimisée avec le système Wyatt Technology, la conservation de la même phase mobile permet une simplification des démarches analytiques et un gain de temps considérable. Tout d'abord la force ionique de la phase mobile utilisée étant constante il ne peut pas y avoir de modifications des charges électrochimiques au niveau de la membrane qui pourraient engendrer des impacts sur la séparation et les molécules de la MOD.

#### iv Calibration et étalons

De nombreuses études ont utilisé l'AF4 pour déterminer les masses moléculaires de macromolécules organiques naturelles (Assemi et al., 2004; Baken et al., 2016; Cuss and Guéguen, 2013; Céline Guéguen et al., 2011; Mangal and Guéguen, 2015; Pifer et al., 2011). La masse moléculaire est un paramètre particulièrement intéressant pour des échantillons environnementaux pour mieux comprendre la dynamique de la MOD en termes de taille et également pouvoir travailler sur des gammes de tailles bien définies. Il est donc nécessaire d'étalonner le système pour déterminer des relations entre le temps de rétention et la masse moléculaire en utilisant des étalons ayant une structure et un comportement proche voire même similaire aux molécules analysées. En 1987, Beckett et al. ont démontré qu'un ensemble de polystyrènes sulfonates (PSS) de différentes masses moléculaires pouvaient être utilisés comme des étalons pour les substances humiques naturelles (Beckett et al., 1987b). Par la suite les PSS ont été largement utilisés pour étalonner le temps de rétention par rapport à la masse moléculaire pour des analyses de substances humiques en FFF ou SEC. La représentativité et la précision de la masse moléculaire obtenue, le coefficient de diffusion ou la distribution de tailles sont dépendantes de l'étalonnage effectué. Depuis de nombreuses années, l'utilisation de ces billes de latex a été rapportée pour l'étalonnage de la répartition de la taille de nanoparticules naturelles et manufacturées (Bouby et al., 2008; Gigault et al., 2014; Poda et al., 2011; Schmidt et al., 2011). Il existe tout de même un biais à l'utilisation de ce genre d'étalons liés à leur comportement dans le système analytique certainement différent par rapport aux molécules naturelles. Ces billes de plastique (latex ou autres) sont des sphères dures alors que ce n'est que rarement le cas pour la MOD, les nanoparticules naturelles voire même manufacturées (Baalousha et al., 2005; Baalousha and Lead, 2007b). Leurs comportements dans le système sont de ce fait bien différents. Il a, d'autre part, été démontré que l'utilisation des PSS comme étalons de masses moléculaires pour la MOD ne permettait pas de créer une corrélation simple entre les molécules de MOD et les PSS (Baalousha et al., 2011; Dycus et al., 1995). Les PSS et les molécules de la MOD ne peuvent en effet pas avoir les mêmes dépendances en termes de coefficient de diffusion et masse moléculaire sous l'influence des propriétés spécifiques (pH et force ionique) des phases mobiles (Dycus et al., 1995). Les variations attendues avec les PSS selon les conditions de séparation (phase mobile) ne peuvent donc pas être les mêmes qu'avec les molécules de la MOD, ce qui entraîne des erreurs systématiques dans les valeurs de masses moléculaires estimées ainsi que de potentielles erreurs d'estimation de linéarité de séparation.

Dans les deux types de méthodes utilisées dans ce travail, les étalons sont des molécules organiques choisies pour leurs propriétés potentiellement proches du comportement des molécules constituant la MOD au contraire de billes plastiques telles que les polystyrènes latex, polyéthylènes glycols ou

polystyrènes sulfonâtes qui ont été largement utilisées (Assemi et al., 2004; Baalousha and Lead, 2007a; Benedetti et al., 2002; Worms et al., 2010; Zanardi-Lamardo et al., 2002). Ces étalons sont donc supposés avoir un comportement proche des molécules de la MOD dans la phase mobile utilisée alors que les billes de pastique inertes ne sont que très peu influencées par les propriétés physico-chimiques de la phase mobile voire de la membrane. Les courbes de calibration déterminées avec ces étalons synthétiques ne sont ainsi pas forcément représentatives et peuvent être une source d'erreur dans l'estimation de la taille moléculaire et de la linéarité de la séparation des molécules organiques.

Les calibrations mises en place pour les deux méthodes utilisées ici ont des spécificités bien distinctes. La méthode Postnova utilise une calibration à base de 5 étalons couvrant une gamme de 550 Da à 14300 Da, particulièrement centrée sur les petites masses moléculaires (< 1500 Da). Elle permet donc de mieux estimer les masses moléculaires et l'effet de la phase mobile autour de 1 kDa. Par contre elle ne permet pas de travailler sur des colloïdes de plus grandes tailles (supérieures à 10 kDa). L'utilisation de 5 étalons en mélange détectés à l'aide d'un détecteur DAD à plusieurs longueurs d'onde permet un gain de temps considérable, mais la détermination des pics peut être complexe. Dans la méthode Wyatt, l'utilisation de 8 étalons organiques a permis de travailler sur un très large éventail de tailles couvrant une gamme de 1350 Da à 66500 Da. Ce type de calibration à l'aide de molécules organiques se rapprochant des réalités environnementales n'a jamais été utilisé jusqu'ici sur une aussi grande gamme de tailles. Les étalons ont été injectés séparément afin de s'affranchir de potentiellement problèmes d'interactions inter-étalons. Cependant l'injection des 8 étalons séparément entraîne un temps de calibration non négligeable (environ 3h30).

## v Détecteur

Comme décrit (chapitre 2), la technique AF4 peut être appliquée à la détermination de la masse moléculaire moyenne et au fractionnement selon la distribution en tailles des molécules de la MOD. Le calcul du diamètre hydrodynamique en utilisant des détecteurs spécifiques (détecteurs à diffusion de lumière) est basé sur l'application de la relation de Stokes-Einstein en supposant que les particules sont des sphères dures et que leurs tailles soit suffisamment grandes pour la sensibilité du système. Ceci n'est pas toujours le cas pour les molécules de la MOD, ce qui suggère la nécessité d'utiliser un détecteur permettant d'effectuer une mesure indépendante et complémentaire de la distribution de taille des particules.

Des détecteurs, en ligne ou hors ligne, permettent d'obtenir un large éventail d'informations sur d'autres propriétés de molécules analysées telles que la composition, la concentration, les propriétés optiques, l'interaction avec les métaux traces ou encore la structure (Baalousha et al., 2006b; Batchelli

et al., 2009; Boehme and Wells, 2006; Hassellöv et al., 1999; Lyvén et al., 2003; Stolpe et al., 2010a, 2010b; Wells, 2004).

Dans de très nombreuses études, le détecteur UV-Vis a été utilisé comme détecteur en ligne en AF4. De plus, il a souvent été supposé que l'absorbance UV détectée est proportionnelle à la concentration en molécules. Cependant, l'absorbance UV est un paramètre très complexe dépendant à la fois de l'absorption de la lumière et de la diffraction. Il varie avec la longueur d'onde de la lumière, la taille et la composition en chromophores des molécules de la MOD. L'absorption de la lumière de groupes fonctionnels organiques aromatiques et phénoliques est beaucoup plus forte pour ce genre de molécules que d'autres nanoparticules organiques et inorganiques (Weishaar et al., 2003). Il est donc approprié d'utiliser l'UV/Vis comme détecteur dans l'étude d'échantillons de MOD naturelle riche en molécules chromophoriques. Les deux longueurs d'onde fréquemment utilisées pour la détection sont 254 nm et 280 nm. Il a cependant été démontré que la capacité d'absorption des substances humiques (MOD) à 280 nm augmente avec la masse moléculaire (Chin et al., 1994). Par conséquent, il a finalement été recommandé l'utilisation de la longueur d'onde à 254 nm pour l'étude de la MOD afin d'être le plus juste et représentatif possible (Zhou et al., 2000).

Le détecteur utilisé dans les deux méthodes AF4 est donc bien un détecteur UV/Vis à une longueur d'onde de 254 nm.

## vi Mise en œuvre

Ainsi en termes de mise en œuvre, les deux méthodes utilisées dans cette étude présentent des spécificités bien différentes. La méthode utilisant le système Postnova Analytics a été déployée dans différentes études sur la MOD naturelle (Cuss and Guéguen, 2015, 2012; Guéguen et al., 2013; Guéguen and Cuss, 2011; Mangal and Guéguen, 2015) et a permis d'étudier l'évolution et la dynamique de la MOD dans des écosystèmes aquatiques naturels mais majoritairement en eaux douces. Cette méthode a donc été utilisée dans ce travail de thèse pour l'étude de la dynamique de la MOD dans l'estuaire en couplage avec la spectrofluorimétrie et a fait l'objet d'un article donné en Annexe 2 « Examining molecular size of aquatic dissolved organic matter along a salinity gradient using asymmetrical flow field-flow fractionation and EEM fluorescence » pour soumission à Environmental Science and Pollution Research.

La méthode utilisant le système Wyatt Technology, optimisée dans ce travail et détaillée dans le chapitre précédent, apparaît, quant à elle, comme une méthode permettant de travailler sur une plus grande gamme de tailles tout en permettant une simplification de la mise en œuvre en conservant la même phase mobile quelles que soient les propriétés physico-chimiques des échantillons naturels.

Cette méthode s'est donc avérée plus efficace pour l'étude de la dynamique de la MOD dans des milieux complexes soumis à de fortes variations comme les estuaires. Dans le cas d'études sur des échantillons aux caractéristiques physico-chimiques variables elle permettrait donc un gain de temps considérable.

### III Conclusions et perspectives

L'application de ces deux méthodologies AF4 pour l'étude de la dynamique et de l'évolution de la MOD dans les écosystèmes aquatiques naturels a permis de mettre en avant leurs différences, leurs avantages et leurs limites. Ces deux méthodes optimisées pour l'étude de la MOD ont conduit à l'utilisation de conditions analytiques sensiblement différentes (membrane, phase mobile et flux) et de ce fait à l'obtention de résultats contrastés. Les tendances observées dans le cas de l'estuaire étudié restaient toutefois les mêmes, les deux méthodes ont mis en avant une diminution de la masse moléculaire moyenne de la MOD le long de l'estuaire de la Gironde d'amont en aval.

La méthode utilisée pour le système Postnova équipé d'une membrane de 300 Da permet l'étude de la MOD de plus petite taille en comparaison avec la méthode développée pour le système Wyatt équipé d'une membrane de 1 kDa. Cependant cette dernière méthode permet de travailler sur une plus grande gamme de tailles, elle est donc plus polyvalente malgré des pertes possibles des plus petites molécules.

La différence majeure entre ces deux méthodes se trouve dans le temps d'analyse beaucoup plus long pour la méthode utilisant le système Postnova. Ainsi selon les propriétés des échantillons étudiés, il peut être préférable d'utiliser la méthode Wyatt. La méthode Postnova utilisée depuis quelques années a montré son efficacité et son applicabilité pour l'étude de la MOD naturelle. Elle permet de travailler sur une gamme de tailles intégrant les très faibles masses moléculaires pour de la MOD naturelle (jusqu'à 300 Da). Cependant cette méthode est plus difficile et longue à mettre en œuvre dans le cadre d'étude sur des écosystèmes complexes soumis à de fortes variations des paramètres physico-chimiques environnementaux comme les estuaires.

Afin de poursuivre cette étude, la méthode optimisée pour le système Wyatt Technology a été appliquée à des études de plus grande ampleur sur la dynamique de la MOD dans des milieux complexes. Pour ce faire les prochains chapitres sont consacrés à l'étude de la dynamique de la MOD dans les estuaires de la Gironde et de la Seine par AF4 et spectrophotométrie/spectrofluorimétrie.







Chapitre V Etude de la dynamique de la matière organique dissoute en estuaire de Gironde – Application de l'AF4 associée aux techniques spectroscopiques

Le chapitre précédent a présenté la comparaison de deux méthodes de séparation de la MOD naturelle par AF4 : l'une optimisée dans le cadre de ces travaux de thèse et une autre utilisée dans le cadre d'une mobilité au Canada (Université de Trent, Ontario). La méthode optimisée dans le cadre de ces travaux de thèse ayant montré de bonnes performances analytiques pour l'analyse de séries d'échantillons avec de fortes variations de leurs propriétés physico-chimiques (salinité et pH), elle a pu être appliquée à l'estuaire de la Gironde afin de tester sa robustesse sur un jeu d'échantillons plus conséquent. Ainsi ce chapitre présente l'étude de la dynamique de la taille et des propriétés optiques de la MOD pour des échantillons prélevés au cours de la campagne HALOGIR en septembre 2014 dans l'estuaire de la Gironde.

Ce chapitre est rédigé sous forme d'article pour soumission à *Marine chemistry*.

# Variations in dissolved organic matter molecular weight and optical properties along a microtidal estuary

Submitted to *Marine chemistry* (18/11/2016)

## Abstract

During the estuarine transport from river to the open ocean, dissolved organic matter (DOM) changed significantly. On the one hand, DOM undergoes transformations and degradation by chemical and biological processes and fresh autochthonous organic matter may be produced. DOM properties are directly impacted by these processes along an estuary. The objective of this work was to better characterize DOM dynamics in the Gironde estuary using a variety of analytical tools widely used nowadays. Absorbance and fluorescence analyses were used as optical proxies to follow and describe DOM through estuaries and coastal waters. Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) was used as a proxy of the DOM molecular weight in aquatic environments. We examined changes in DOM properties along the Gironde estuary. The distributions of dissolved organic carbon (DOC) concentration, DOM absorbance and fluorescence as well as molecular weight highlighted significant changes with salinity. Our results showed high negative correlations with the salinity gradient for the variables DOC, fluorescence intensities ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$ ), humification index (HIX), DOM molecular weight and absorbance at 254nm, whereas three DOM parameters (biological index (BIX), spectral slope ratio (SR) and fluorescence band  $\gamma$ ) were highly correlated with salinity. The investigated DOM characteristics were thus highly correlated, indicating no specific physico-chemical transformations along the salinity continuum. Large variations in DOM characteristics between the two extreme opposite sites of the estuary, as expected conservative mixing models, are not able to describe the changes in DOM properties along the Gironde estuary. Based on the principal component analysis (PCA), the estuary was divided in four zones depending on salinity and DOM characteristics. (i) Terrestrial DOM at low salinity (<7) with high DOC concentration and an increase of  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  fluorescence intensities, high DOM molecular weights and humification. (ii) A mid-upper estuarine zone (salinity around 7-12) characterized by low autotrophic production with low values of BIX and high values of HIX, a rapid decrease in DOM molecular weight. (iii) A lower estuarine zone (salinity around 12-27) characterized by a strongly degraded organic material, as shown by the decrease in HIX and low DOM molecular weight. (iv) A coastal zone with higher salinities (>27) characterized by an increased autochthonous production and specific marine influence with highest BIX and lowest HIX values associated with lower DOM molecular weight.

**Keywords:** Dissolved organic matter, asymmetrical flow field-flow fractionation, DOM molecular weight, Principal component analysis, fluorescence

## I Introduction

In the global context of anthropogenic forcing and in a complex ecosystem like an estuary, the study of aquatic dissolved organic matter (DOM) is of significant environmental interest. DOM can interact with organic or inorganic contaminants, such as metals, pesticides, pharmaceuticals or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) directly resulting from anthropogenic activities. DOM can influence their transport, stability, behavior and bioavailability in aquatic ecosystems (Aiken et al., 2011; Akkanen et al., 2004; Amy and Drewes, 2007; Duan et al., 2013; Oesterreich et al., 1999; Peña et al., 2011; Philippe and Schaumann, 2014; Yamashita and Jaffé, 2008). Associations between organic or inorganic species with aquatic DOM may contribute to the persistence and the transport of these contaminants in the environment (Kan and Tomson, 1990; McCarthy and Zachara, 1989; Santschi et al., 1999, 1997), however at the same time their toxicity against organisms can increase or decrease (Akkanen, 2002; Bejarano et al., 2005). Indeed to better understand mechanisms involved in the processes of transport and evolution of these contaminants it seems to be primordial to examine the characteristics and properties of organic molecules in the aquatic ecosystems. Especially, in specific environments such as coastal ecosystems which constitute exceptional exchange areas between terrestrial and oceanic zones, estuaries are particularly important areas, especially for the carbon cycle, where DOM can be subjected to biotic and abiotic modifications because of changes in physical and chemical conditions (Bianchi, 2006). DOM can play a key role in a multitude of processes and cycles, on biological point of view with the influence of DOM in bacterial production and microbial food processes using the microbial loop (Jiao et al., 2010) and also on the chemical point of view with the carbon cycle (Carlson et al., 2007; Hedges, 1992; Jiao et al., 2010). In estuaries, DOM cycles are often dominated by the conservative mixing processes (Guéguen and Cuss, 2011; Kowalczyk et al., 2010; Markager et al., 2011; Retamal et al., 2007), but flocculation, resuspension, in situ production, photo bleaching as well as biological degradation may occur and a maximum turbidity zone (MTZ) can influence the behavior of DOM depending on the estuary (Alling et al., 2010; Gardner et al., 2005; Tzortziou et al., 2007). Therefore, the knowledge of sources, abundance, composition and dynamics of DOM is important in order to better understand aquatic ecosystems. A few studies dealing with organic matter behavior in the Gironde estuary have been reported in the literature and highlighted the complexity of this estuary in peculiar with the presence of a large MTZ (Doxaran et al., 2009; Fontugne and Jouanneau, 1987; Herman and Heip, 1999; Huguet et al., 2009; Jalón-Rojas et al., 2015).

Dissolved organic matter is ubiquitous in aquatic ecosystems. It consists of a heterogeneous mixture of organic compounds with a very wide range of possible sizes. Its chemical diversity and complexity make the study of DOM difficult. In aquatic systems DOM can come from allochthonous and

autochthonous sources such as riverine discharges and in situ production, respectively (Bauer and Bianchi, 2011). A fraction of DOM is colored (Colored Dissolved Organic Matter; CDOM) and a subfraction of it is fluorescent (Fluorescent Dissolved Organic Matter; FDOM) which allows to trace it and to study it using spectroscopic technics. The properties of the heterogeneous DOM can be analyzed using a multitude of analytical approaches such as fluorescence, spectroscopy UV/Vis, asymmetrical flow field-flow fractionation or size exclusion chromatography (Asmala et al., 2016; Huguet et al., 2009; Nebbioso and Piccolo, 2013; Shi et al., 2016). All the individual descriptors of DOM have been used to link the chemical and dynamical properties of DOM with the biogeochemical and environmental changes. The role of fresh and marine waters has been studied especially to know the different nutrient processes. Some biological and chemical processes within an estuary can alter, increase or decrease DOM along a salinity gradient. Although evolutions of DOM along estuaries have been widely studied, some works have shown a significant non-conservative mixing in the DOM dynamics (Asmala et al., 2014; Huguet et al., 2009; Markager et al., 2011) whereas most authors have not successfully separated intern processes (removal, production...) from conservative mixing (Bowers et al., 2004; Guo et al., 2007; Spencer et al., 2007a).

The question whether DOM evolves along the salinity gradient of a macrotidal highly turbid estuary, is crucial in order to better understand its transport at the land-sea interface. The present study was conducted in the Gironde estuary (southwestern France), a highly turbid estuary of great ecological importance. The objective was to follow the evolution of DOM during the mixing of fresh and marine waters. Furthermore our aim was to characterize DOM using different analytical approaches (asymmetrical flow field-flow fractionation, fluorescence and absorbance analyses...) and link the produced results to obtain a large view of the DOM properties and evolution along the salinity gradient.

## II Experimental

### 1 Study Site and Sampling Strategy

The Gironde estuary results from the junction of the Garonne and Dordogne rivers at Bec d'Ambès. The Gironde estuary (Figure V-1) is often described as the largest one in Western Europe with its nearly 80 km distance and covering approximately 625 km<sup>2</sup> at high tide. With previous studies, the hydrology and geochemistry of the Gironde have been well-documented (Abril et al., 1999; Allen et al., 1972; Castaing and Allen, 1981; Jalón-Rojas et al., 2015; Sottolichio and Castaing, 1999). The Gironde estuary is a macrotidal estuary (tidal amplitude: 1.5–5 m), characterized by a large maximum turbidity zone

(MTZ) ( $\text{SPM} > 1 \text{ g L}^{-1}$ ). Its estimated mean annual flow rate is  $760 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  and the residence time of water typically ranges between 1–3 months.

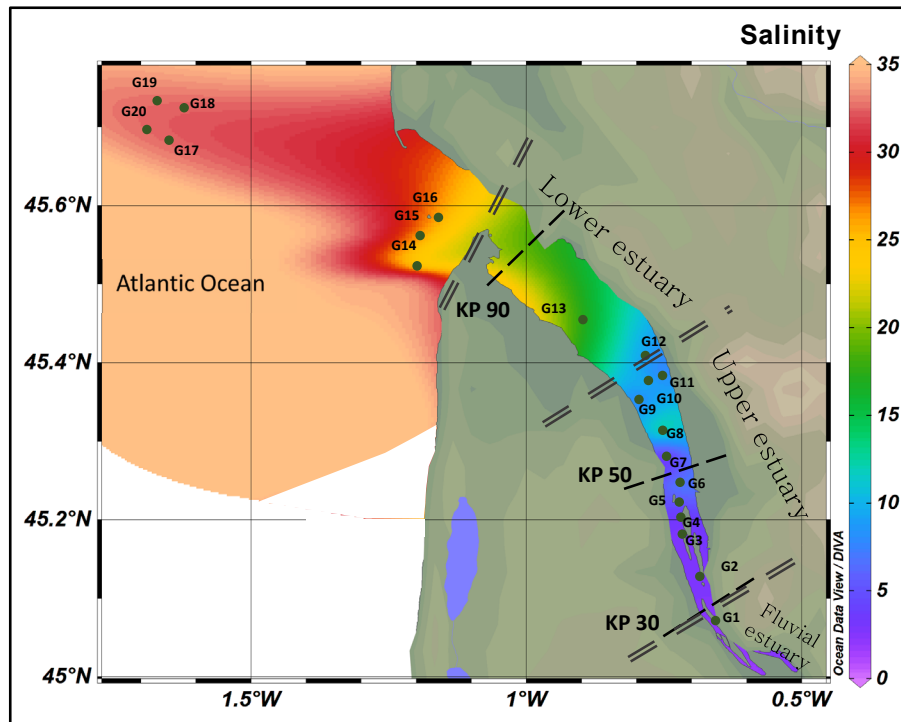


Figure V-1: General setting of the Gironde estuary and sampling strategy along the longitudinal salinity gradient (KP: kilometric point, distance in kilometers from the city of Bordeaux (KP 0))

The HALOGIR sampling campaign took place in September 2014 (3rd–7th) aboard the R/V Côtes de la Manche. The sampling strategy was to take a series of orthogonal transects following a general South-to-North salinity gradient, totaling 20 sampling locations from transects G1 to G20 (Figure V-1). The sites (G17 to G20), located approximately 50 km west from the estuary, were also included in the survey to estimate of the DOM dynamics and transfer along the saline estuarine gradient and from the Gironde estuary to the Atlantic Ocean continental shelf. For every sampling location, subsurface (1 m below surface) and bottom water (1 m above sediments) samples were collected for a total of 39 samples (Figure V-1; **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Before the filtration through pre-combusted ( $450^\circ\text{C}$ ) filters Whatman GF/F ( $0.7 \mu\text{m}$ ) using Nalgene® polyethylene filtration units, sample temperature, pH and salinity with a multiparameter sondes (WTW, Multi340i) were measured. Samples were filtered immediately after sampling and then kept in the dark and at  $4^\circ\text{C}$  until analyses.

Table V-1 : Characteristics of water samples collected from the Gironde estuary (DOC: Dissolved organic carbon; SPM: suspended particulate matter)

Samples	Depth	Salinity	pH	Temperature	DOC (mg.L <sup>-1</sup> )	Standard deviation DOC (mg.L <sup>-1</sup> )	SPM (mg.L <sup>-1</sup> )
1 S	Surface	2.3	8.0	25.7	1.63	0.05	115
2 S	Surface	2.9	7.8	22.4	1.72	0.05	305
3 S	Surface	3.5	7.7	22.2	1.49	0.03	589
4 S	Surface	3.8	7.9	24.0	1.46	0.09	128
5 S	Surface	4.9	8.0	24.9	1.52	0.02	233
6 S	Surface	5.8	8.0	24.3	1.46	0.01	647
7 S	Surface	6.9	8.0	24.8	1.45	0.03	292
8 S	Surface	7.2	7.9	24.2	1.41	0.05	358
9 S	Surface	7.9	8.0	22.7	1.65	0.03	69
10 S	Surface	8.2	8.0	24.1	1.40	0.04	48
11 S	Surface	9.8	7.9	24.8	1.37	0.04	488
12 S	Surface	12.0	8.0	24.1	1.40	0	60
13 S	Surface	17.5	8.0	22.6	1.32	0.05	24
14 S	Surface	24.1	8.0	23.3	1.10	0.01	25
15 S	Surface	25.8	8.0	23.1	1.13	0.03	14
16 S	Surface	26.6	8.0	23.0	1.12	0.01	17
17 S	Surface	32.4	8.6	22.2	1.12	0.01	14
18 S	Surface	32.5	8.2	22.2	1.12	0.02	11
19 S	Surface	32.6	8.2	22.2	1.07	0.04	32
20 S	Surface	32.7	8.1	21.5	1.11	0.04	15
1 F	Bottom	2.1	8.0	25.1	1.44	0.02	575
2 F	Bottom	2.6	7.8	22.2	1.80	0.08	1346
3 F	Bottom	3.9	7.8	24.4	1.56	0.03	340
4 F	Bottom	4.5	7.5	22.7	1.54	0.03	1685
5 F	Bottom	5.8	8.0	25.0	1.43	0.03	1573
6 F	Bottom	6.0	7.9	24.8	1.45	0.03	1669
7 F	Bottom	6.8	7.9	25.0	1.42	0.01	960
8 F	Bottom	7.2	7.9	24.6	1.47	0.03	1152
9 F	Bottom	8.2	8.0	24.1	1.41	0.02	2586
10 F	Bottom	9.6	7.9	24.6	1.41	0.01	1291
11 F	Bottom	14.1	8.0	24.3	1.35	0.05	247
12 F	Bottom	22.3	8.0	22.4	1.22	0.02	189
13 F	Bottom	23.5	7.9	23.3	1.17	0.01	100
14 F	Bottom	26.1	8.0	23.0	1.07	0.04	33
15 F	Bottom	27.6	7.9	22.7	1.07	0.04	26
16 F	Bottom	27.9	8.0	22.6	1.05	0.03	34
17 F	Bottom	33.0	8.0	16.6	0.76	0.05	16
18 F	Bottom	33.1	8.1	20.4	0.88	0.03	17
19 F	Bottom	33.4	8.2	17.4	0.71	0.05	22



## 2 DOM analysis

### *a Field flow fractionation*

The asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) system, used in this study, was an Eclipse 3 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany). The trapezoidal channel was 14.5 cm in length and 0.6 and 2.1 cm in width. Flow rates were controlled using an Agilent Technologies 1200 series isocratic pump, equipped with a micro-vacuum degasser. This system was coupled to a UV detector set at 254 nm (Agilent Technologies 200 series). The experimental conditions were optimized using 5 mM phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) mobile phase. The channel was equipped with a 490  $\mu\text{m}$  spacer and a semi-permeable polyether sulfone membrane with a molecular cut-off of 1 kDa. Detector flow was set at 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The constant crossflow was set at 3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The injection volume used was 1 mL for natural samples and 100  $\mu\text{L}$  for standard solutions. Two calibrations per day of the AF4 system were carried out with 8 organic molecules (Vitamin B12: 1.35 kDa; Aprotinin: 6.5 kDa; Cytochrom C: 12.4 kDa; Lysosym: 14.3 kDa; Myoglobin: 17 kDa; Carbonic anhydrase: 29 kDa; Albumin: 44.28 kDa; BSA: 66.5 kDa). Using this calibration method, two DOM apparent molecular weights (AMW) were then calculated per day for each sample and averaged.

### *b Absorbance analysis*

DOM UV–visible absorbance measurements were made on a Jasco V-560 spectrophotometer over a wavelength region of 210–700 nm with a 1 cm path length quartz cuvette (Hellma). The UV–visible absorbance spectrum of ultrapure water was subtracted from the water sample spectra. The measured absorbance at wavelength  $\lambda$  was converted to the absorption coefficient  $a$  ( $\text{m}^{-1}$ ) according to the relationship:

$$a_{\lambda} = 2.303 * A_{\lambda}/L$$

Where  $A_{\lambda}$  is the absorbance and L is the path length of the optical cell in meter (here 0.01m). Four absorbance indices were calculated as described in Table V-2.

### *c Fluorescence*

A fluorescence spectrometer (Fluorolog FL3-22 HORIBA Jobin Yvon) was used to obtain the three-dimensional excitation-emission matrix (EEM) spectra of the DOM samples with excitation wavelengths in the range of 250–410 nm and with emission wavelengths ranging from 260 to 700 nm as described by Parlanti et al.(2000). Samples were contained in a 1 cm path length fused silica cell (Hellma). Spectra were corrected for instrument biases using protocols suggested by the manufacturer and by subtracting ultrapure water blank spectra, recorded under the same conditions, to eliminate

water Rayleigh and Raman scattering peaks and finally, the EEMs were normalized to the area of an ultrapure water Raman peak measured at excitation 350 nm (Huguet et al., 2009; Lawaetz and Stedmon, 2009). The fluorescence intensities were shown on a unified scale of Raman units (r.u.).

In order to avoid an inner-filtering effect, the UV–visible absorbance spectrum of water samples was systematically recorded before analysis using spectrofluorometry. The fluorescence intensity is proportional to the concentration of fluorescent compounds only for a low absorbance (< 0.1). When the maximum absorbance (250 nm in this study) was higher than 0.1, samples were diluted with ultrapure water. The UV–visible absorbance spectrum was then recorded again to control the maximum absorbance value and define the dilution correction factor to apply to EEM spectra.

Two fluorescence indices (HIX and BIX) and the emission intensity of four fluorescence bands ( $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) for water samples were calculated and used as described in Table V-2.

### *d DOC and SPM*

DOC was measured using a Shimadzu total organic carbon analyzer (TOC-V CSN). The instrument was performed in non purgeable organic carbon (NPOC) mode. The calibration was run using a standard solution of potassium hydrogen phthalate  $C_6H_4(COOK)(COOH)$ . For each run, the result is the mean of at least three satisfactory injections in terms of standard deviation (<0.1) and variation coefficient (<2%). At least two certified reference waters (Environment Canada, purchased by ANALAB) were systematically analyzed within each samples series in order to validate DOC measurements.

The SPM concentration was determined by filtration through dry pre-weighed filters (Whatman GF/F, 0.7  $\mu$ m). The filters were dried to constant weight (45 °C).

## 3 Statistical analyses

Statistical tests discussed in the text (unpaired t-test, one-way ANOVA, linear correlation and regression, Spearman correlation) were conducted with SigmaPlot for Windows Version 12.0. Statistical significance was set as  $p < 0.05$ . Statistical tests (Principal Component Analysis) and hierarchical clustering were performed with the R statistical software (R version 2.15.3, R Core Team, 2013).

Table V-2: Definition and significance of the DOM indices used in this study

Absorbance indices	Calculation	Description
$a_{254}$	Absorption coefficient at wavelength 254 nm ( $m^{-1}$ )	Tracer of chromophoric DOM distribution
$S_{275-295}$	Calculated using linear regression of the log – transformed spectra of the absorption coefficients	Information on DOM molecular weight and the influence of terrigenous DOM inputs. Negatively correlated with DOM molecular weight (Chin et al., 1994; Fichot and Benner, 2012; Helms et al., 2008)
SR	The ratio of the slope of the shorter wavelength region (275–295 nm) to that of the longer wavelength region (350–400 nm) using the non-linear regression technique (Stedmon et al., 2000)	An indirect measure of the average molecular weight (AMW) of DOM Low values (SR < 1) indicate higher AMW High values (1 < SR < 2) indicate lower AMW (Helms et al. 2008)
SUVA	The sample UV absorbance at 254 nm divided by the DOC concentration measured ( $L.mgC^{-1}.m^{-1}$ )	A higher number is associated with greater aromatic content (Weishaar et al. 2003)
Fluorescence indices/bands	Calculation	Description
Biological Index (BIX)	Ratio between fluorescence intensity at 380 nm vs 430 nm in emission ( $I_{380}/I_{430}$ ), at 310 nm excitation wavelength	Values between 0.8 and 1.0 correspond to freshly produced DOM of biological or microbial origin, whereas values below 0.6 are considered to contain lower autochthonous OM (Huguet et al. 2009).
Humification Index (HIX)	Ratio of the emission spectrum areas between 300–345 nm and 435–480 nm in emission at 254 nm excitation wavelength (Zsolnay et al., 1999)	Estimation the degree of humification of DOM based on the shift towards longer wavelengths of the emission maximum for an increase of aromatic carbon content of DOM
$\alpha$	Excitation: 330-370 nm Emission: 420-480 nm	Humic-like material (Huguet et al., 2009)
$\alpha'$	Excitation: 230-260 nm Emission: 380-480 nm	Humic-like material + recent materials (Huguet et al., 2009)
$\beta$	Excitation: 310-320 nm Emission: 380-420 nm	Biological and microbial materials Autochthonous production (Huguet et al., 2009)
$\gamma$	Excitation: 270-280 nm Emission: 300-340 nm	Protein-like material (Huguet et al., 2009) Fresh-like (Hansen et al., 2016)

### III Results and discussion

All the samples were analyzed using AF4, UV spectrometer and EEM spectroscopy in order to observe the DOM evolution along the salinity gradient in the Gironde estuary. DOC and SPM were also determined.

#### 1 Water Quality Parameters and Hydrology

The water physicochemical parameters (temperature, pH, DOC and SPM) are given in the **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Salinity increased from 2.1–2.3 at Bec d'Ambès (sampling point G1) to 25.5–27.2 (in the estuary; sampling point G13) and outside the estuary 32.6–33.1 (sampling point G17 to G20).

Suspended particulate matter (SPM) presented wide variations from 11 to 647 mg.L<sup>-1</sup> at the surface position and from 16 to 2586 mg.L<sup>-1</sup> at the bottom position (Figure V-2). The average of SPM concentrations were 174 mg.L<sup>-1</sup> in surface waters and 729 mg.L<sup>-1</sup> near the bottom of the water column. Dissolved organic carbon (DOC) was relatively stable with an average for the first part of the estuary (salinity 2-9) at 1.50 mg.L<sup>-1</sup>, then the average decreased to 1.36 mg.L<sup>-1</sup> in the middle of the estuary (salinity 12-18), and to 1.11 mg.L<sup>-1</sup> in the lower estuary (salinity 22 and 28) and finally it was below 1.10 mg.L<sup>-1</sup> offshore (Figure V-2). Samples from the coastal zone presented specific characteristics of marine environments with high salinities (surface: 32.6 and bottom: 33.1), SPM amount lower than 20 mg.L<sup>-1</sup> and DOC around 1 mg.L<sup>-1</sup> (Figure V-2).

During the sampling, the water flow rate, calculated with the combined discharges of the Garonne River at Tonneins and the Dordogne River at Pessac-sur-Dordogne, was typical of summer low-flow period with 280–289 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>.

Along the river-seawater transect in the Gironde estuary, concentrations of DOC decreased from 1.72 mg.L<sup>-1</sup> at the lowest salinity to 1.07 mg.L<sup>-1</sup> at the highest salinity in surface water samples with a mean value of 1.35 mg.L<sup>-1</sup> and from 1.80 mg.L<sup>-1</sup> at the lowest salinity to 0.71 mg.L<sup>-1</sup> at the highest salinity in bottom waters with a mean value of 1.27 mg.L<sup>-1</sup>. No significant difference was found between surface and bottom waters ( $p=0.334$ ). In contrast the upper and lower estuaries and the coastal zone are significantly different considering DOC concentrations ( $p<0.01$ ).

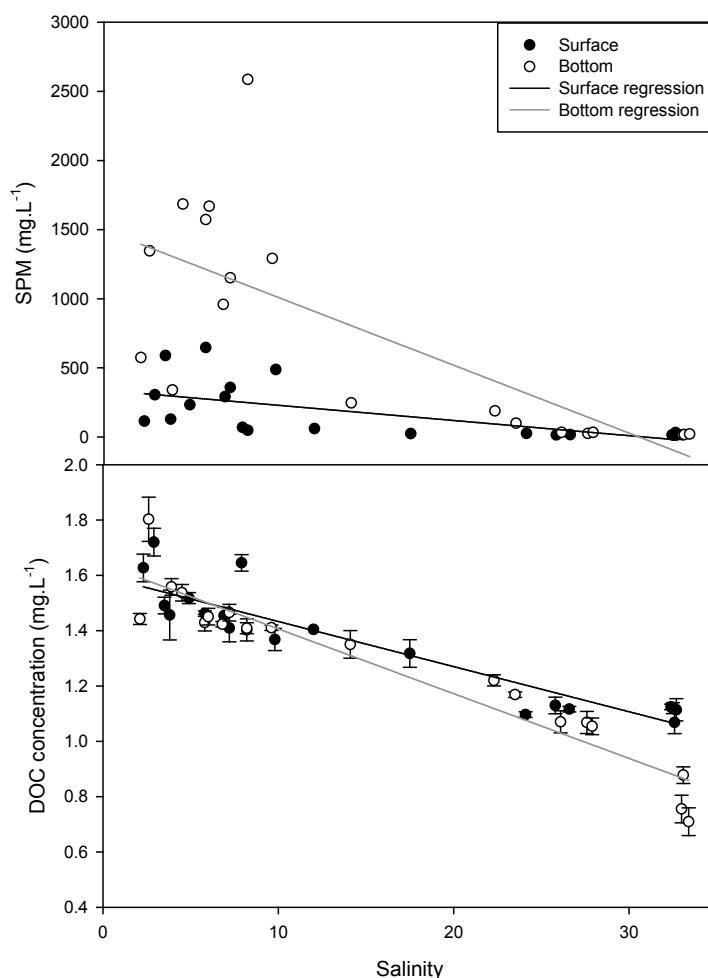


Figure V-2: SPM and DOC concentration with standard deviations vs. salinity for surface (black dots) and bottom (white dots) samples along the Gironde estuary

## 2 Spatial Variations of DOM compositional parameters

### *a Variations in chromophoric DOM characteristics*

The absorption coefficient at 254 nm ( $a_{254}$ ) ranged from  $4.09 \text{ m}^{-1}$  to  $17.42 \text{ m}^{-1}$  (average  $11.97 \pm 3.88$ ) in subsurface samples and ranged from  $3.08 \text{ m}^{-1}$  to  $13.49 \text{ m}^{-1}$  (average  $8.46 \pm 3.45 \text{ m}^{-1}$ ) in the bottom (Figure V-3). Values of  $a_{254}$  were significantly greater in subsurface than those in bottom waters ( $p = 0.005$ ), showing higher CDOM components in the surface water. Using this chromophoric parameter,  $a_{254}$ , the Gironde estuary can be divided in two significant parts. The upper estuary had higher values than the lower estuary and offshore sites ( $p < 0.001$ ).

The Gironde estuary was characterized by aromatic DOM, as indicated by high  $\text{SUVA}_{254}$  values ranging from 5.36 to  $1.60 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$  (average  $3.79 \pm 1.00 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$ ) for the subsurface water samples and varying from 4.32 to  $1.44 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$  (average  $2.81 \pm 0.84 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$ ) in the bottom waters (Figure V-3). The  $\text{SUVA}_{254}$  values for surface waters typically ranged from  $6 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$  to  $1 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$ . Higher

values were found in the subsurface waters than in the bottom ones which may be explained by higher inputs of allochthonous DOM from terrestrial and anthropogenic sources in surface waters suggesting a heterogeneity in the water column with a weak mixing of the riverine inputs. Two significant zones in the Gironde estuary appeared with the  $SUVA_{254}$  index ( $p=0.001$ ). The upper estuary was characterized by the highest values (average  $3.77 \pm 0.78 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$ ) and the lowest salinities (between 2.3 - 17.5), whereas the lowest  $SUVA_{254}$  values (average  $2.57 \pm 1 \text{ L.mgC}^{-1}.\text{m}^{-1}$ ) and the highest salinities (around 22.5–33.4) were determined for the lower estuary.

The observation of  $S_{275-295}$  and slope ratio (SR), as a proxy of bulk DOM molecular weight, appeared to be affected by estuarine processes. Indeed,  $S_{275-295}$  and SR were significantly different between surface and bottom waters, highlighting differences in the DOM dynamics in the water column along the estuary. Moreover, in the salinity gradient,  $S_{275-295}$  and SR also pointed out two significant zones, the lower and the upper estuary (Figure V-3). The spectral slope  $S_{275-295}$  and SR ranged from 0.013 to 0.025  $\text{nm}^{-1}$  and from 0.38 to 2.58, respectively (Figure V-3). Similar values have been reported in other estuaries (Asmala et al., 2012; Guéguen et al., 2016; Guo et al., 2007; Helms et al., 2008). The highest values of  $S_{275-295}$  have been reported to indicate lower DOM molecular weights and aromaticity (Guéguen and Cuss, 2011; Helms et al., 2008) and these authors have directly related this decrease in molecular weight to the decrease in terrestrial DOM. Comparison of  $S_{275-295}$  values along the Gironde estuary and between surface and bottom water samples suggested that DOM is more aromatic and higher in bottom than in surface ( $p=0.005$ ).

Water distribution of salinity,  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$ ,  $S_{275-295}$  and SR showed contrasting characteristics along the estuary (Figure V-3). The highest salinities (between 22.5 – 33.4) corresponded to brackish waters resulting from the mixing of oceanic and continental waters while the lowest values of  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$ , DOC and high values of  $S_{275-295}$  and SR reflected the contribution of river waters. Indeed, the lower estuary, submitted to river inputs is typically enriched in larger molecular weights (low  $S_{275-295}$  and SR) and aromatic/humic-rich DOM (high  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$ , DOC). These five variables, representing different DOM characteristics, strongly correlated. DOM was thus shown to evolve from the upper to the lower estuary and finally to the coastal waters with a clear mixing between river and ocean waters and associated specific DOM, as already reported by Asmala et al. (2016).

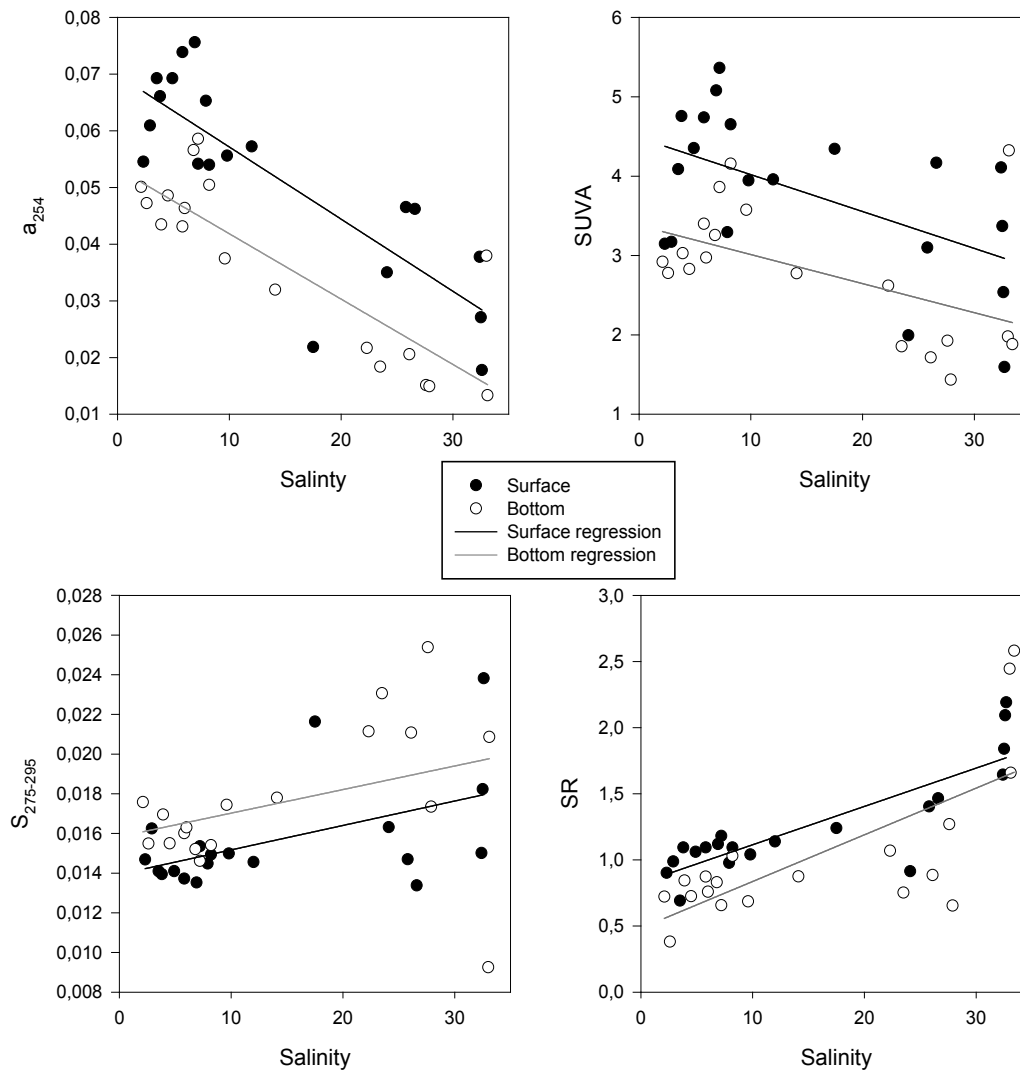


Figure V-3:  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$ ,  $S_{275-295}$  and  $SR$  vs. salinity for surface (black dots) and bottom (white dots) samples along the Gironde estuary

### *b Evolution of fluorescence signal along the Gironde estuary*

The EEM fluorescence spectra determined for all the 39 samples from the Gironde estuary were typical spectra from terrestrial and estuarine waters

No difference was observed between surface and bottom water samples for the four fluorescence bands (Figure V-4). The general trend was a decrease in intensity of all the four fluorescence bands with salinity (Figure V-4), which indicated a decrease in the concentration of fluorescent DOM (FDOM). The relationship between DOM fluorescence and salinity is linear for  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$  DOM bands ( $r^2 = 0.98$ ;  $0.99$ ;  $0.99$  respectively). This noticeable decrease was observed from the sampling point G11 towards the coastal area, whereas upstream this site the trends were almost constant (Figure V-4). On the contrary, for the  $\gamma$  band, the relationship was not linear ( $r^2=0.75$ ). According to the fluorescence

intensity, the mixing of water masses cannot explain the DOM evolution along the Gironde estuary. The relative linear relationships along the estuary are however not the result of a simple dilution effect of terrestrial DOM. Others processes and behavior may influence this mixing and a non-conservative behavior has been reported during mixing of fresh and marine waters in different estuaries (Guo et al., 2007; Stedmon and Markager, 2003; Suryaputra et al., 2015; Yang et al., 2013). In terms of distribution along the salinity gradient, the evolution of the four DOM bands is significant ( $p < 0.001$ ). At salinity 2 (G1), the peaks  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  represented respectively more than 18, 53, 21 and 6 % of the total fluorescence while for the samples in the upper estuary (G14-16) with a salinity around 25-27 these peaks represented 15, 50, 21 and 12 % respectively. Finally samples out of the estuary are significantly different from the estuarine ones with respectively 13, 45, 18 and 21 % for peak  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . Amongst all the fluorescence bands determined along the estuary, the protein-like peak  $\gamma$  presented the greatest variations.

The relationship between fluorescence intensity distribution and DOC concentration along the Gironde estuary presented a relatively good correlation (Figure V-5) whatever the sampling depth. Huguet et al. (2009) reported similar results in the Gironde estuary for samples collected in September 2006. This relative good correlation was also reported in other studies (Chen, 1999; Klinkhammer et al., 2000; Vodacek et al., 1995; Yamashita et al., 2013). Two different trends can however be observed in Figure V-5, for DOC lower and greater than  $1.45 \text{ mg.L}^{-1}$ . For  $\text{DOC} < 1.45 \text{ mg.L}^{-1}$  the fluorescence intensities increased whereas after, corresponding to low salinity samples (lower estuary), the relationship remained constant. This decrease at low DOC content is in agreement with the decrease of fluorescence intensity with salinity. As Huguet et al. (2009) showed previously, at high salinity ( $>15$ ) DOM fluorescence as a proportion of DOC, decreased which was particularly marked for  $\alpha'$ . The photodegradation associated with mixing of fresh and marine waters could explain such evolutions of fluorescence intensity with salinity and DOC.

Absorbance and fluorescence results from our study are consistent with previous studies about DOM in estuarine environments. The major factors impacting the DOM distribution are probably the freshwater and marine-water flows, anthropogenic inputs, autochthonous DOM production and finally removal processes (Callahan et al., 2004; Guo et al., 2007; Huguet et al., 2009).



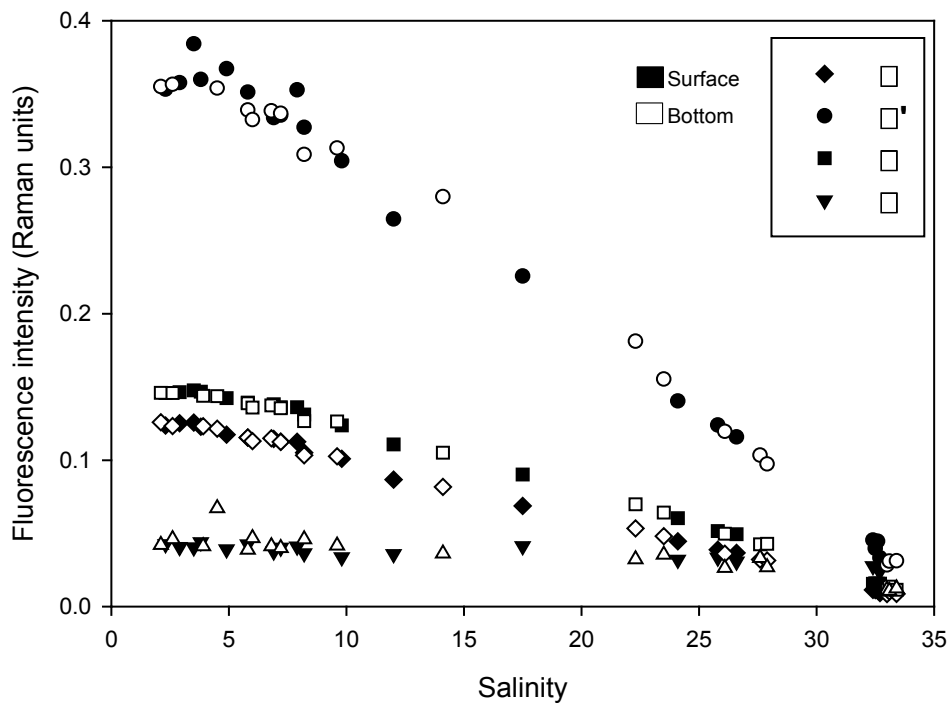


Figure V-4: Fluorescence intensities vs. salinity for surface (black dots) and bottom (white dots) samples along the Gironde estuary

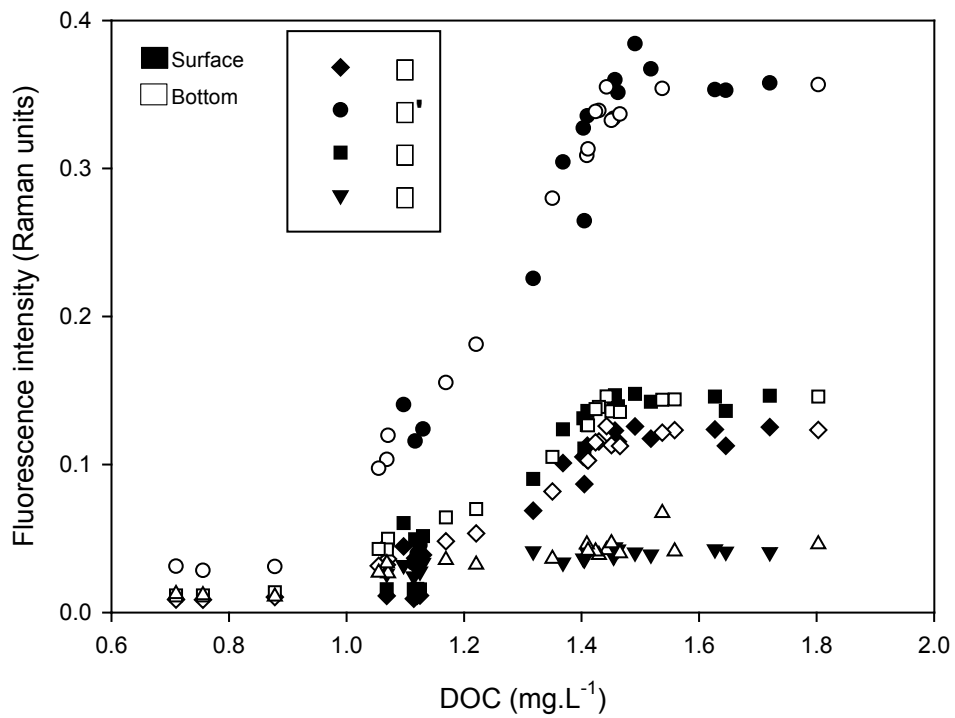


Figure V-5: Fluorescence intensities vs. DOC concentration for surface (black dots) and bottom (white dots) samples along the Gironde estuary

### *c Fluorescence indices HIX and BIX*

Fluorescence spectra can also be used to determine and follow the origin and transformation degree of DOM through indices. Two indices are used: the humification index (HIX, (Zsolnay et al., 1999)) and the biological index (BIX, (Huguet et al., 2009)). These two indices are used to study the complex DOM dynamics in environmental systems. Humification process is associated with the C/H ratio. High HIX values indicate the presence of high molecular weight aromatic molecules (Zsolnay et al., 1999). HIX values commonly range between 0.6 and 0.9 (Huguet et al., 2009; Ohno, 2002). BIX allows to determine the contribution of the fluorophore  $\beta$  which is characteristic of autochthonous production in aquatic samples. An increase in BIX indicates an increase of the relative concentration of the fluorophore  $\beta$ . HIX and BIX have been calculated in the Gironde estuary (Huguet et al., 2009; Vacher, 2004). Previously measured HIX values oscillated between 16 (strongly humified organic material) and 3 (associated with autochthonous DOM). BIX values were between 1 (autochthonous origin of DOM and fresh production into water) and 0.6 (lower DOM production in natural waters) (Huguet et al., 2009).

The HIX and BIX fluorescence indices were calculated for all the samples (Figure V-6). Along the salinity gradient, the HIX, was stable around 14 for low salinities (<7), then HIX values decreased but stayed higher than 8, for salinities until 25, and finally a strong decrease of HIX was observed down to 2.5 for higher salinities. This HIX values determined in this study indicated the presence of strongly humified compounds all along the upper estuary. The part of the estuary characterized by MTZ presented high HIX values. So this region of the estuary (salinities between 7 and 25) seemed to be characterized by highly degraded organic material or in any case more aromatic DOM. Finally for salinities upper than 25, HIX clearly decreased down to 2.5 for the most salty samples (around 34). These very low HIX values are generally observed for dissolved organic molecules of autochthonous biological origin (Huguet et al., 2009). These results are in good agreement with the distribution of FDOM along the estuary and more especially with  $\alpha'$  and  $\alpha$  bands intensity which decreased along the salinity gradient. These decreases in fluorescence intensity represented more than 30 % and 15 % respectively for  $\alpha$  and  $\alpha'$  peaks. In terms of HIX values, the downstream part of the estuary was significantly different ( $p < 0.001$ ). DOM sources were clearly different in this zone with a decrease of humified material, suggesting photo-degradation and/or dilution of these terrestrial inputs as described in earlier studies showing a removal of terrestrial materials due to photobleaching in coastal and estuarine regions with high salinities.

The BIX values (Figure V-6) stayed relatively stable (around 0.65 - 0.7) for salinity values lower than 10. For salinities comprised between 10 and 20, the BIX values presented a little increase with values around and slightly greater than 0.7. In the upper estuary with higher salinities (20-27), the BIX values

increased to 0.8, and finally strongly reached 0.9 for coastal water samples. These results confirmed those obtained with the HIX index and FDOM intensity, the lower and upper estuary could be characterized by a lower biological activity in comparison with high salinity samples (coastal region), characterized by different sources of freshly produced marine DOM (Huguet et al., 2010; Zhou et al., 2016).

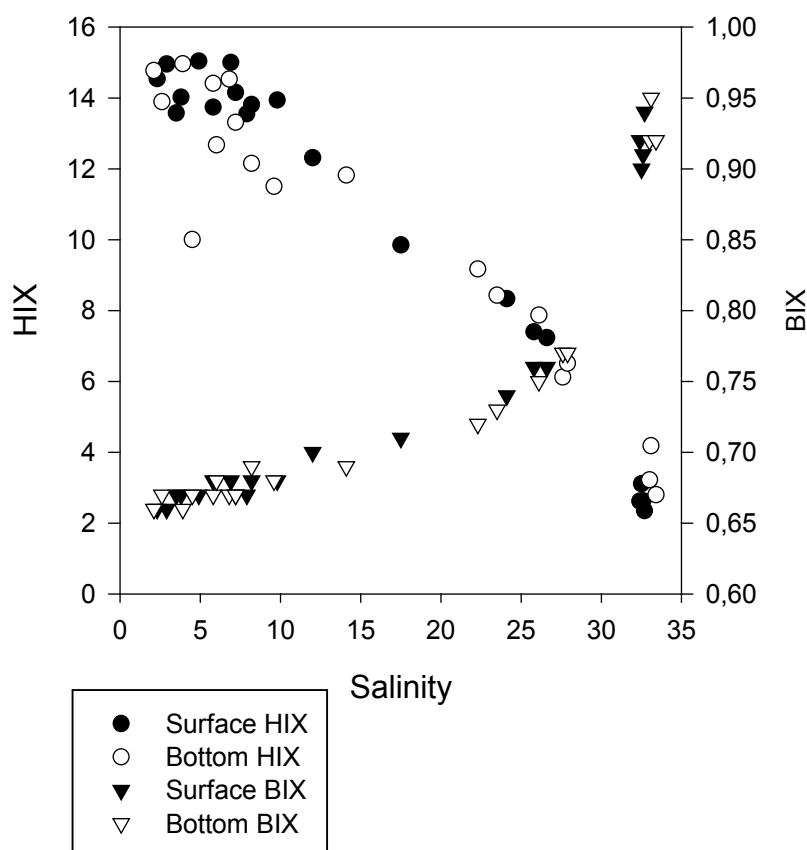


Figure V-6: HIX and BIX variations along the Gironde estuary for surface (black dots) and bottom (white dots) samples along the Gironde estuary

### *d DOM molecular weight evolution*

AF4 has then been used in order to determine the DOM mean apparent molecular weight (AMW) distribution along the salinity gradient (Figure V-7). Monitoring the DOM molecular weight evolution allowed us to highlight a significant decrease along the salinity gradient for both subsurface and bottom samples (Figure V-7). Nevertheless three specific zones along the estuary can be described by the DOM AMW evolution ( $p < 0.001$ ). At low salinity (2-7.2) in the upstream estuary, we obtained the highest AMW (average  $1782 \pm 50$  Da). The trend was clearly on the decrease since the AMW was reduced from 1861 to 1743 Da and from 1873 to 1715 Da for surface and bottom samples respectively. As expected, the highest values were found for the lowest salinities because of the direct influence of

terrestrial water as already shown with fluorescence and UV/Vis indices. But as regards the decrease of the molecular weight in this range of salinity, the DOC, fluorescence and UV/Vis indices discussed above were not so informative (Figure V-2; Figure V-4; Figure V-6; Figure V-7). Then, always in the upper estuary (salinity 7.9-12), the AMW continued to decrease (average  $1704 \pm 34$  Da) in accordance with the fluorescence intensity variations (Figure V-4). Finally in the zone of stronger salinities (>15), the DOM size was stable with the lowest AMW (average  $1639 \pm 13$  Da). However, fluorescence, DOC and UV/Vis results highlighted a DOM evolution with for example an increase of BIX or a decrease of fluorescence intensities whereas DOM AMW showed no notable variation (Figure V-7).

These three zones of the Gironde estuary considering DOM AMW were statistically significantly different ( $p < 0.001$ ) and a multiple comparison showed that the upper estuary with the lowest salinities and the middle estuary are statistically significantly different ( $p < 0.05$ ) from the lower estuary with the highest salinities, whereas the upper and middle estuaries were not statistically different.

The DOM size distributions observed in this work agreed with other AF4-studies in marine and estuarine environments (Hassellöv, 2005; Stolpe et al., 2014, 2010b; Zanardi-Lamardo et al., 2002).

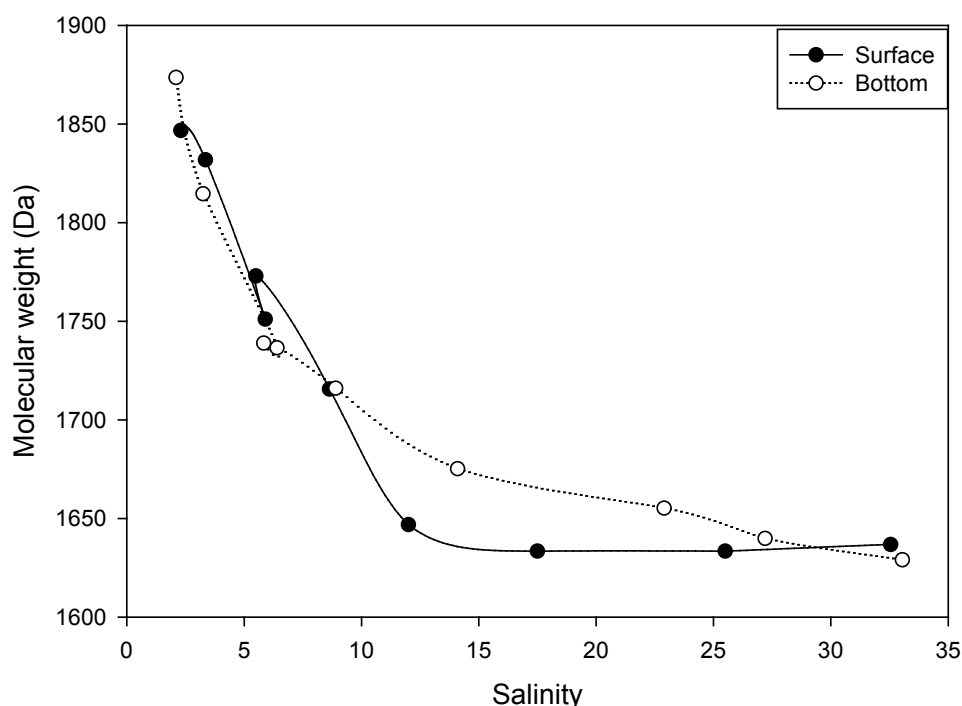


Figure V-7: DOM molecular weight vs. salinity for surface (black dots) and bottom (white dots) samples along the Gironde estuary

### 3 Principal component analysis and influence of hydrography

In order to illustrate the previous observations and to comprehensively assess spatial differences in the dynamics of DOM, principal component analysis (PCA) was performed using salinity, depth, DOC concentration, spectrophotometry indices ( $a_{254}$ , SUVA,  $S_{275-295}$  and SR), fluorescence indices and intensities normalized (HIX, BIX,  $\alpha$ .nor,  $\alpha'$ .nor,  $\beta$ .nor,  $\gamma$ .nor (normalized)) and the DOM AMW. The intensity of the fluorescence bands ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) was normalized by the total fluorescence (sum of intensities of the four bands  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ).

The first two principal components accounted for 70.75 % (Dim 1) and 15.30 % (Dim 2) of the total variance, respectively (Figure V-8). The summation of the first two principal components already accounted for 86 % of the whole variance, which was enough to explain the variation tendencies of the variables. Based on the weight of the contribution of each variable in the PCA, the DOM AMW, aromatic moieties ( $a_{254}$ , SUVA, HIX), DOC concentration and humic-like materials (normalized fluorescence bands  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$ ) displayed high positive contributions (correlation > 0.5) in the Dim 1 whereas salinity, SR, BIX and the  $\gamma$  normalized band of fluorescence had negative contributions (correlation < -0.5) in the Dim 1 (Figure V-8). Dim 2 showed a strong positive correlation (correlation > 0.5) for parameters associated with aromatic moieties (SUVA and  $a_{254}$ ) and surface depth while negative correlation (correlation < -0.5) was obtained with CDOM descriptor ( $S_{275-295}$ ) and bottom depth.

The scores plot (Figure V 8) showed six significantly different clusters. Along the dim 1, the 39 samples were disposed in function of their salinities, lowest salinities at the highest values and inversely. In the dim 2, the depth was described with the surface samples mostly placed in the positive values and the near-bottom samples placed in negative values. Graphical representations of PCA output (Figure V-8) allowed us to visualize the distribution of the 39 samples in relation with each other. Scores of our samples clearly support the trends with freshwater-marine water in Dim 1 and with surface-bottom samples in Dim 2.

Scores of the cluster 1, marine/coastal samples (G17, G19 and G20), exhibited high negative values on the Dim 1 and scores around 0, except for G17S sample, on the Dim 2, indicating that the coastal area is associated with low AMW, high biological activity, low aromatic content and high salinity. Scores for clusters 2 and 3, representing samples from the upper estuary with salinities between 26 and 12, were also in the negative part in the Dim 1 and cluster 2 was positive in the Dim 2 while cluster 3 was the most negative, reflecting the less marine character than cluster 1 and the sample depth. The last three clusters (4, 5 and 6), regrouping samples from the upper estuary with salinities around 12 and 2, were

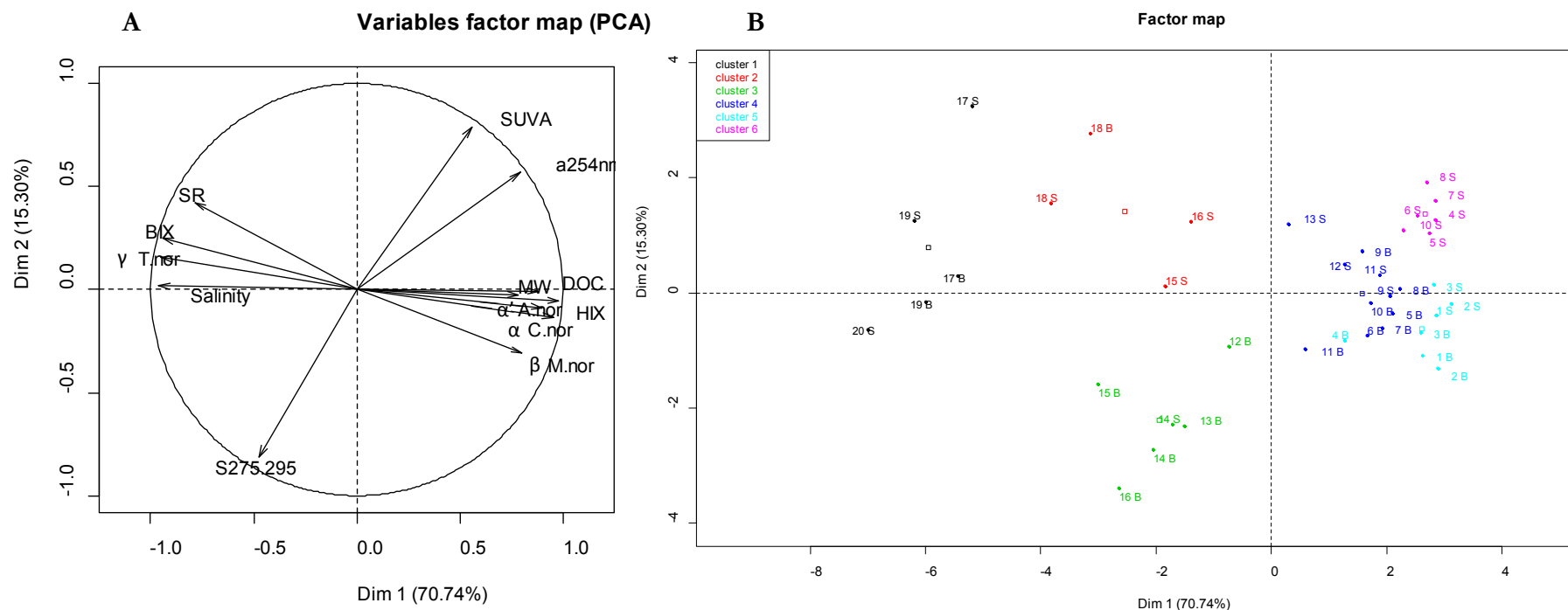
more positive in the Dim1 and around 0 (with negative and positive values) for cluster 4. Scores were negative for the cluster 5 and positive for the cluster 6 in the Dim2 representing a clear influence of the terrestrial water (fluvial estuary) in the upper estuary with high AMW, aromaticity and humic-like characters.

The PCA suggested four different zones in the Gironde estuary along the salinity gradient, the upper estuary for salinities 2-7 and 7-12, the lower estuary for salinities 12-27 and the coastal region (>27). These different zones have specific DOM characteristics. The PCA also allowed us to discriminate the samples depth using the aromaticity and DOM descriptors (SUVA<sub>254</sub>, a<sub>254</sub> and S<sub>275-295</sub>).

These results and the separation in four parts of the estuary are in agreement with previous studies (Huguet et al., 2009) where the authors described the estuary in three different zones according to fluorescence descriptors, the first one with salinities between 0 and 5, the second with salinities between 5 and 25 and finally the third one for salinities higher than 25. Our work allowed us to discriminate two different areas in the second zone previously proposed.

PCA was then used to examine the relationships between the DOM parameters (Figure V-8). Moreover, PCA results have been compared to salinity, DOC concentration and SPM to better understand the dynamics along the estuary. Because of the strong correlation between the first principal component (Dim 1) with the salinity and the DOC concentration (Supplementary information 1) it is possible to conclude that Dim 1 described the mixing of fresh and marine waters and the evolution of DOM along the estuary. The second principal component (Dim 2) cannot be correlated with salinity, DOC concentration or SPM, indicating some DOM transformation processes not described by the mixing of water masses. Dim 2 was considered as a processing allowing to discriminate samples according to their depth with no effect of the waters mixing.

The different characteristics of DOM were highly correlated (Figure V-8), even if different analytical methods were used. These high correlations observed between the different DOM parameters showed changes along the salinity gradient which were in accordance with the reactivity continuum concept (Amon and Benner, 1996). Finally these parameters highlighted the processes affecting the DOM characteristics in decreasing of size and aromaticity and in losing carbon along the salinity continuum.



	Salinity	DOC	C.nor	A.nor	M.nor	T.nor	HIX	BIX	MW	a <sub>254nm</sub>	SUVA	S <sub>275,295</sub>	SR	Bottom	Surface	Variance	% of variance	Cumulative % of variance
<b>Dim.1</b>	-0,96	0,88	0,95	0,90	0,80	-0,95	0,98	-0,94	0,78	0,79	0,56	-0,48	-0,79	-0,17	0,16	9,20	<b>70,75</b>	70,75
<b>Dim.2</b>	0,02	-0,01	-0,13	-0,09	-0,31	0,16	-0,05	0,25	-0,03	0,57	0,79	-0,81	0,42	-0,74	0,71	1,99	<b>15,30</b>	86,05
<b>Dim.3</b>	-0,22	0,37	-0,11	-0,23	-0,37	0,24	0,04	0,04	0,54	0,02	-0,17	0,07	0,03	-0,09	0,08	0,77	<b>5,95</b>	92,00

Figure V-8: Results of principal component analysis (PCA). (A) Loading plots for PC1 and PC2. (B) Sample scores for the first two principal components. (C) Principal component loading in the different variables for the first three dimensions..

## 4 Correlations

All the PCA variables were tested using Spearman's rank correlation coefficient. The Spearman correlation is a non-parametric statistic test of how strongly two variables are related to another one, with reduced sensitivity to outliers and no assumptions on the distribution of the measurements. The Spearman correlation permitted to examine the relationships between 13 variables, environmental parameter (salinity), DOC concentration, fluorescence indices (HIX and BIX) and normalized intensities ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), DOM AMW and UV/Vis indices ( $SUVA_{254}$ ,  $S_{275-295}$ , SR and  $a_{254nm}$ ). Spearman's correlation coefficients were calculated (Supplementary information 2) to complete the PCA analysis by determining the statistical correlations between variables. Among the quantitative parameters high negative correlations ( $p < 0.001$ ) were observed between salinity and DOC concentration, three fluorescence bands ( $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$ ), humification index, DOM AMW and absorbance ( $a_{254}$ ). High positive correlations ( $p < 0.001$ ) were found between salinity and protein-like fluorescence band ( $\gamma$ ), biological index (BIX), slope ratio (SR). These correlations confirmed the PCA analysis results with more terrestrial DOM in the upper estuary and changes in DOM characteristics along the estuary towards the coastal zone.

We observed stronger correlations ( $p < 0.001$ ) between  $SUVA_{254}$ , HIX,  $a_{254}$  and AMW because all these parameters are linked to aromaticity and molecular weight as previously reported (Helms et al., 2008; Robert G M Spencer et al., 2009; Weishaar et al., 2003). HIX was also negatively correlated ( $p < 0.01$ ) with BIX and Slope ratio (SR). To validate the relationship between the DOM molecular weight (AMW) and the slope ratio (SR) respectively calculated with AF4 and spectrophotometry, we observed a strong negative correlation between the both ( $p < 0.001$ ) confirming that SR increases while MW decreases and *vice versa*.

We expected a correlation between the SUVA and DOM AMW but our results suggested that these parameters cannot be linked in this estuary because of some specific processes occurring such as flocculation or due to the presence of MTZ.

## IV Conclusion

The goal of this study was to better characterize changes in DOM properties along a salinity gradient and more particularly in the Gironde estuary. The combination of different parameters (optical properties, AMW, DOC) was tested in order to discriminate DOM characteristics and evolution along a salinity gradient. The DOM optical properties and molecular weights changed strongly, as DOM composition underwent degradation and/or autochthonous production. The DOM biogeochemical

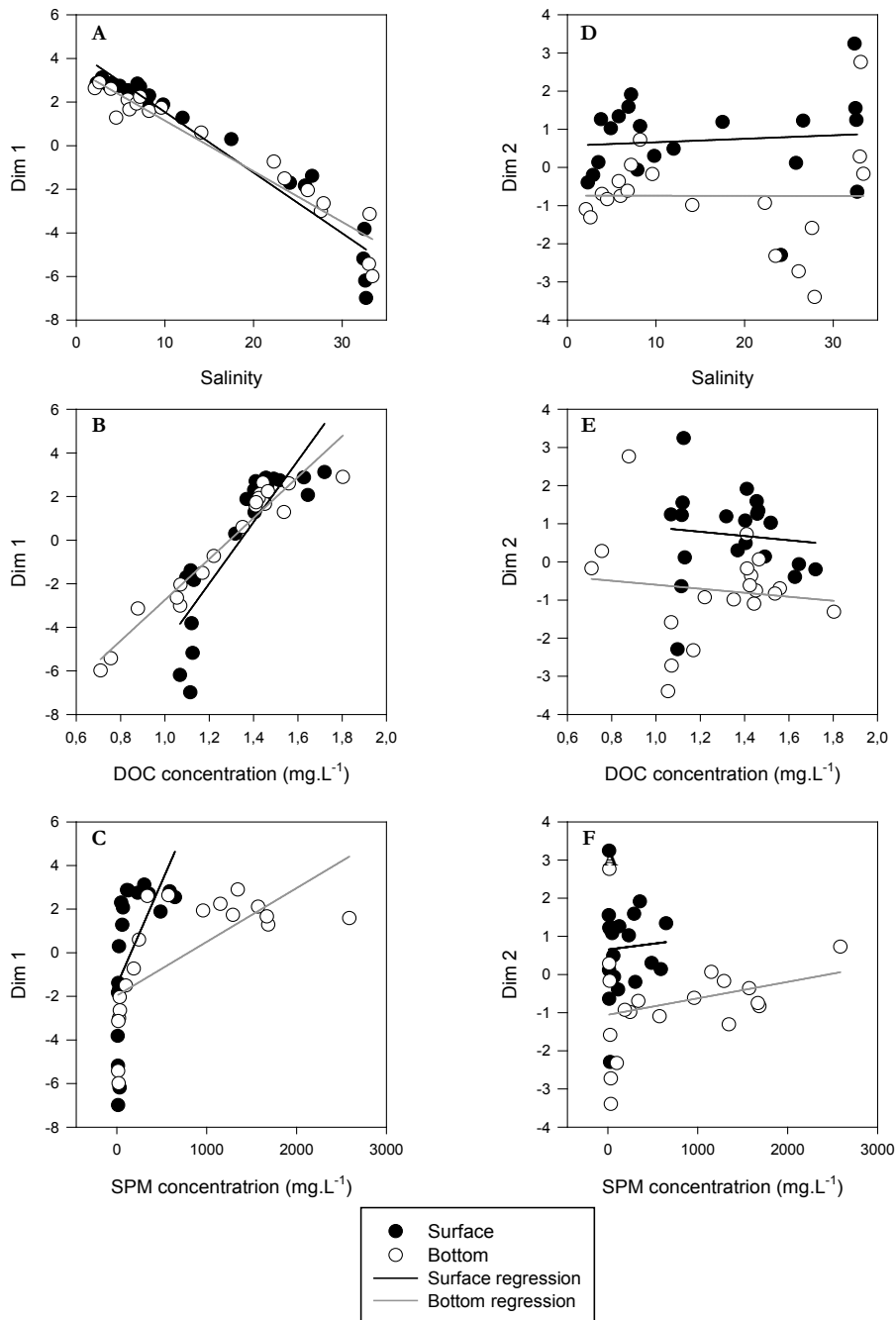


cycle is complex and dynamic along a salinity gradient, where transformation, degradation and production of DOM take place continuously. Our results showed that mixing between river and oceanic waters is one of the main factors influencing DOM characteristics along the estuarine gradient. However the mixing could only partially account for DOM changes which highlighted the importance of other processes occurring in the estuary. The maximum turbidity zone (MTZ) in the Gironde estuary may have a great role in DOM transformations and biological as well as chemical degradations which could be associated to the decrease of humification processes (decrease of HIX) coupled with the increase of biological activity (BIX). Finally, the analytical and statistical combined approach for the study of all these parameters (environmental parameter (salinity), DOC concentration, fluorescence indices (HIX and BIX) and fluorescence bands ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), DOM AMW and UV/Vis indices ( $SUVA_{254}$ ,  $S_{275-295}$ , SR and  $a_{254}$ ) allowed us to discriminate four zones (salinities 2-7, 7-12, 17-27 and >27) of specific DOM characteristics in the Gironde estuary.

## **Acknowledgment**

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

## Supplementary information



**SI 1:** Relationship of the two first principal components (Dim 1 and Dim 2) versus salinity, DOC concentration and suspended particulate matter (SPM). (A-C) Dim 1 (“Mixing” along the estuary). (D-F) Dim 2 (Surface-bottom transect). Regression  $r^2$  (A) surface = 0.93; bottom = 0.934. Regression  $r^2$  (B) surface = 0.74; bottom = 0.927. Regression  $r^2$  (C) surface = 0.334; bottom = 0.465. Regression  $r^2$  (D) surface = 0.08; bottom = 8.E-6. Regression  $r^2$  (E) surface = 0.01; bottom = 0.013. Regression  $r^2$  (F) surface = 0.03; bottom = 0.064

	<i>Salinity</i>	<i>DOC</i>	$\alpha$ - <i>nor</i>	$\alpha'$ - <i>nor</i>	$\beta$ - <i>nor</i>	$\gamma$ - <i>nor</i>	<i>HIX</i>	<i>BIX</i>	<i>AMW</i>	$a_{254}$	<i>SUVA</i> <sub>254</sub>	<i>S</i> <sub>275-295</sub>	<i>SR</i>
<i>Salinity</i>	1	-0.932 ***	-0.922 ***	-0.652 ***	-0.668 ***	0.825 ***	-0.894 ***	0.959 ***	-0.926 ***	-0.654 ***	-0.345 *	n.s.	0.639 ***
<i>DOC</i>		1	0.841 ***	0.66 ***	0.566 ***	-0.783 ***	0.826 ***	-0.917 ***	0.873 ***	0.701 ***	0.386 *	-0.355 *	-0.573 ***
$\alpha$ - <i>nor</i>			1	0.607 ***	0.81 ***	-0.841 ***	0.928 ***	-0.923 ***	0.85 ***	0.65 ***	0.392 *	-0.348 *	-0.609 ***
$\alpha'$ - <i>nor</i>				1	0.506 **	-0.859 ***	0.741 ***	-0.701 ***	0.614 ***	0.688 ***	0.469 **	-0.329 *	-0.462 **
$\beta$ - <i>nor</i>					1	-0.747 ***	0.812 ***	-0.702 ***	0.574 ***	0.578 ***	0.371 *	-0.32 *	-0.461 **
$\gamma$ - <i>nor</i>						1	-0.933 ***	0.865 ***	-0.776 ***	-0.743 ***	-0.498 **	0.404 *	0.511 ***
<i>HIX</i>							1	-0.915 ***	0.831 ***	0.715 ***	0.462 **	-0.411 **	-0.495 **
<i>BIX</i>								1	-0.894 ***	-0.638 ***	-0.323 *	n.s.	0.643 ***
<i>AMW</i>									1	0.594 ***	n.s.	n.s.	-0.575 ***
$a_{254}$										1	0.884 ***	-0.796 ***	n.s.
<i>SUVA</i> <sub>254</sub>											1	-0.942 ***	n.s.
<i>S</i> <sub>275-295</sub>												1	n.s.
<i>SR</i>													1

Significant coefficients \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  are shown, n.s. = not significant.

SI 2: Spearman correlation coefficients between DOM parameters





Chapitre VI Etude de la dynamique de la matière  
organique dissoute en estuaire de Seine –  
Application de l'AF4 associée aux techniques  
spectroscopiques

Le chapitre précédent a montré l'intérêt et la robustesse de la méthode développée dans le cadre de ces travaux de thèse pour l'étude de la MOD pour des échantillons naturels provenant de l'estuaire de la Gironde. En effet une évolution de la MOD (diminution de la taille et du caractère terrigène) le long du continuum rivière-océan a été montrée, diminution de la taille et du caractère terrigène de la MOD associé à une augmentation de MOD autochtone. Cependant, certains paramètres comme l'influence de la marée ou la saisonnalité n'ont pas été testés.

Ainsi ce chapitre 6 présente l'étude de la MOD le long de l'estuaire de Seine par les méthodes décrites précédemment. Il est rédigé sous la forme de deux articles.

Le premier, pour soumission à « *Estuarine, Coastal and Shelf Science* », porte sur des échantillons ayant été prélevés en estuaire de Seine en avril 2016 à trois périodes du cycle de marée (pleine mer, jusant et basse mer).

Le second article, pour soumission à « *Water Research* », prend en compte l'influence saisonnière en comparant les résultats obtenus en conditions estivale et hivernale (septembre 2015 et avril 2016). L'application des techniques AF4, spectrométrie UV/Vis et de fluorescence a entraîné l'acquisition d'un large jeu de données (23 variables et 56 échantillons). Afin de mieux exploiter ce grand jeu de données, différentes méthodes statistiques ont été appliquées (Analyse par composante principale, modèle de régression linéaire multiple, corrélation de Spearman et Self Organizing Maps).

L'ensemble des résultats obtenus à l'aide des différentes techniques d'analyse pour les deux campagnes d'échantillonnage menées sur la Seine en Septembre 2015 et Avril 2016 sont présentés en Annexe 3.

# Characterization of dissolved organic matter from river to ocean in the Seine estuary using molecular weight distribution and optical properties

To be submitted to *Estuarine, Coastal and Shelf Science*

## Abstract

Estuarine systems link terrestrial and marine water cycles. This study focused on the dynamics of dissolved organic matter (DOM) along the Seine River-to-ocean continuum from the fluvial estuary to the English Channel along 125 km and taking into account the tidal effects. Dissolved organic carbon (DOC) and DOM absorbance were measured. We characterized DOM molecular weight distribution via asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled with absorbance detector. DOM in the fluvial estuary was largely dominated by high molecular weight and aromatic material whereas the coastal DOM was more heterogeneous with a strong influence of autochthonous and degraded DOM.

A multivariate analysis on all 38 surface and bottom water samples revealed that the DOM variability along the estuary was mainly influenced by the input of terrigenous DOM, while, during high tide, the results suggested inputs from coastal waters characterized by low molecular weights, aromatic DOM and DOC. Finally this study allowed us to conclude on a non-conservative mixing behavior of DOM during river-ocean mixing, with the possible action of removal processes (flocculation or degradation) during mixing. This study confirmed and highlighted that absorbing and molecular weight measurements were powerful tools to trace and differentiate DOM from multiple sources, and to better understand aquatic biogeochemical cycles.

## Keywords

DOM, CDOM; Absorption spectroscopy; Molecular weight distribution; Estuary

## Highlights

Dissolved organic matter dynamics in estuary were studied using absorption and molecular weight distribution

Distinct changes in DOM characteristics with tide and spatial position were observed

Effects of freshwater discharge in the estuary were evaluated



## I Introduction

River and estuarine zones are the primary link between land and oceans and participate to connecting over 87 % of the Earth's land surface area to its coasts (Hedges et al., 1997). Rivers and estuaries are specific regions of transitions between lands with predominantly freshwater to oceans with predominantly sea-water. Estuarine fluxes of materials are controlled by physical processes (river discharge, tidal currents, resuspension, sedimentation...) but also by the biological and abiological degradation, alteration and remineralization. In this way, the Seine Estuary has historically been studied to better understand its maximum turbidity zone (MTZ) (Deloffre et al., 2006; Garnier et al., 2008) associated with sedimentation and transportation processes, especially with the origin and role of particulate organic carbon (Etcheber et al., 2007; Servais and Garnier, 2006).

Dissolved organic matter (DOM) in transition zones like estuaries strongly influences biological, physical and chemical properties of waters. DOM in aquatic ecosystems often exerts strong chemical controls on geochemical (Hoch et al., 2000) and photochemical (Moran and Covert, 2003) reactions. DOM can also interact with trace metals (Aiken et al., 2011) and organic pollutants (Ding et al., 2013; Maoz and Chefetz, 2010), strengthening their solubility, transport and bioavailability properties. It can be considered as a major component of aquatic environments and it comprises a variety of organic constituents with a large panel of molecular weights (Beckett et al., 1987a), structures and compositions (Yamashita and Tanoue, 2003). DOM size, composition and dissolved organic carbon (DOC) concentration are influenced and controlled by the complex interactions of physical forces, photochemical and microbial processes which can also affect the DOM distribution, transport, transformation and degradation (Moran and Zepp, 1997). One of the major DOM sources in coastal and estuarine zones are the terrestrial inputs through the river discharges, but another contributors to the DOM pool in these zones are production and transformation from phytoplankton, zooplankton and the microbial pump (Jiao et al., 2010; Maie et al., 2006a). The type of DOM transported in rivers is depending on the specific rivers and the characteristics of the surrounding watersheds. An important question remains on the exact magnitude, size, type and composition of DOM being delivered to the ocean by the estuary system. However it is clear that a large part of the river inputs are degraded or altered in estuaries and coastal areas. The tidal effect in estuaries on DOM size and composition clearly needs to be investigated in order to increase knowledge on the inputs from coastal areas and on the different allochthonous and autochthonous sources of DOM, and their transformation products. Moreover, inputs of marine-derived DOM to estuaries can be more straightforward than inputs from rivers or estuaries due to the relatively more specific signature in size, composition and type of purely marine-derived DOM (Hansell and Carlson, 2014). But in reality, marine, terrestrial and autochthonous inputs to estuaries gave rise to a more complex mixture composed of materials from various origins

that passed through degradation, sedimentation and a multitude of processes along the estuary. DOM characteristics could thus be significantly different or modified depending on spatial and temporal parameters.

The DOM molecular weight (MW) evolution in aquatic ecosystems can be measured using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) or size-exclusion chromatography (SEC) techniques. Previous studies have found DOM MW distribution ranging from approximately 300 to 4300 Da, with the smallest MW associated to protein-like components and the larger ones associated with humic-like constituents (Balch and Guéguen, 2015b; Boehme and Wells, 2006; Cuss and Guéguen, 2012; Her et al., 2003; Maie et al., 2007). There is a growing interest in understanding the MW distribution of DOM in estuarine zones, in order to get information about DOM dynamics along a complex gradient (salinity, chemical, physical and biological forces). Combining MW determination and optical properties of DOM could provide new tracers of biogeochemical and carbon cycles. DOM was analyzed along a transect from the river until the coastal area (170km) for its MW and optical characteristics in a complex macrotidal estuary, the Seine estuary. Four sites at three tide periods (high, low and ebb tide) in surface and near-bottom depths of the water column were sampled in the estuary as well as a transect of fourteen points upstream.

Samples were further analyzed with absorbance and AF4 was used to determine the molecular weight distribution of DOM. The results of these analyses combined with dissolved organic carbon (DOC) concentration, salinity and tide parameters provided a great dataset to explore multivariate analysis approaches. The objectives of this study were to examine the composition, abundance, MW and spatial distribution of DOM in the Seine Estuary and to provide new insights on DOM dynamics in this estuary.

## II Experimental

### 1 Study Site and Sampling Strategy

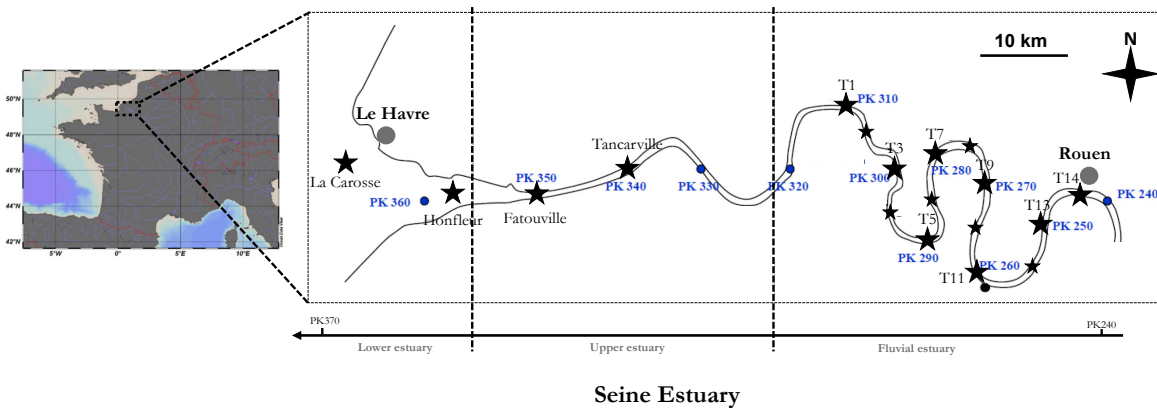


Figure VI-1: A map of the study area and sample locations in the Seine estuary (black stars: sampling point; KP: kilometric point, distance in kilometers from the city of Paris (KP 0))

Located in the north-western France, the Seine estuary (Figure VI-1) is the largest macrotidal estuary along the English Channel, with an area of 150 km<sup>2</sup> at high tide. Freshwater inputs into the estuary are principally from the Seine River with a drainage area of approximately 78 650 km<sup>2</sup>. Discharges vary seasonally, from a maximum of 2000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> in winter to a minimum of 100-200 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> in summer. The Seine estuary is characterized by a maximal turbidity zone (MTZ), generally located in the upper estuary, with suspended matter concentrations higher than 1-2 g.L<sup>-1</sup> (Servais and Garnier, 2006). Association of the morphology, regular dredging and the presence of embankments foster the penetration of marine waters into the upstream estuary. Because of 25% of the French population and 30% of the industry and agriculture (Servais and Garnier, 2006) are along the Seine River and estuary, it is an important area for the French economy.

Four sampling sites in the brackish waters of the Seine estuary and fourteen locations in the fluvial estuary were investigated in the present study. La Carosse, located at kilometric point (KP) 370, was selected as a coastal site in the lower estuary. Honfleur and Fatouville (respectively KP 355 and 350) were chosen as lower estuary points under the tidal influence. Tancarville (KP 340) represented the last point sampled in the upper estuary under influence of the salt tide. For each site, samples were taken at three tide periods, during the high tide (HT), ebb tide (ET) and low tide (LT) and two depths, surface and bottom. The transect covers a distance of over 65 km along the river estuary (from KP310 to 245). Water samples were collected from the Seine estuary on board the R/V Cotes de la Manche between the 23<sup>th</sup> and 26<sup>th</sup> of April 2016 for a total of 28 samples. Although the sample collection occurred in April, during this sampling period and previous weeks the weather conditions were wintry.

The waters were filtered through pre-combusted at 450°C glass fiber filters (Whatman, GF/F 0.70 µm) immediately after sampling and stored in the dark at 4°C until analyses (Table VI-1).

*Table VI-1: Characteristics of water samples collected in the Seine estuary (DOC: Dissolved Organic Carbon; S: Surface; B: Bottom LT: Low Tide; ET: Ebb Tide; HT: High Tide; NT: No Tide)*

<i>Names</i>	<i>Positions</i>	<i>Sites</i>	<i>Tide</i>	<i>Salinity</i>	<i>Temperature</i>	<i>DOC</i>
<i>TT 1 S</i>	Surface	Tancarville	LT	0	13	2.83
<i>TT 2 S</i>	Surface	Tancarville	ET	0	13	3.14
<i>TT 3 S</i>	Surface	Tancarville	HT	1	13	2.97
<i>TT 1 B</i>	Depth	Tancarville	LT	0	13	2.52
<i>TT 2 B</i>	Depth	Tancarville	ET	0	13	2.6
<i>TT 3 B</i>	Depth	Tancarville	HT	1	13	2.66
<i>BT 1 S</i>	Surface	Fatouville	LT	0	13	3.27
<i>BT 2 S</i>	Surface	Fatouville	ET	5	13	2.53
<i>BT 3 S</i>	Surface	Fatouville	HT	12	12	2.43
<i>BT 1 B</i>	Depth	Fatouville	LT	0	13	2.94
<i>BT 2 B</i>	Depth	Fatouville	ET	8	12	3.18
<i>BT 3 B</i>	Depth	Fatouville	HT	21	11	1.85
<i>HT 1 S</i>	Surface	Honfleur	LT	1	13	2.68
<i>HT 2 S</i>	Surface	Honfleur	ET	6	13	2.51
<i>HT 3 S</i>	Surface	Honfleur	HT	19	12	1.94
<i>HT 1 B</i>	Depth	Honfleur	LT	1	13	2.73
<i>HT 2 B</i>	Depth	Honfleur	ET	6	13	2.66
<i>HT 3 B</i>	Depth	Honfleur	HT	26	11	1.75
<i>LCT 1 S</i>	Surface	La Carosse	LT	31	10	1.24
<i>LCT 2 S</i>	Surface	La Carosse	ET	33	10	1.16
<i>LCT 3 S</i>	Surface	La Carosse	HT	32	10	1.1
<i>LCT 1 B</i>	Depth	La Carosse	LT	33	10	1.42
<i>LCT 2 B</i>	Depth	La Carosse	ET	33	10	1.16
<i>LCT 3 B</i>	Depth	La Carosse	HT	33	10	1.18
<i>T 1 S</i>	Surface	Transect	NT	0	14	2.73
<i>T 2 S</i>	Surface	Transect	NT	0	14	2.55
<i>T 3 S</i>	Surface	Transect	NT	0	14	2.48
<i>T 4 S</i>	Surface	Transect	NT	0	14	2.41
<i>T 5 S</i>	Surface	Transect	NT	0	14	2.43
<i>T 6 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.41
<i>T 7 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.49
<i>T 8 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.5
<i>T 9 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.5
<i>T 10 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.51
<i>T 11 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.49
<i>T 12 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.52
<i>T 13 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.55
<i>T 14 S</i>	Surface	Transect	NT	0	13	2.51

## 2.DOM analyzes

### *a DOC and Absorbance analyzes*

Concentrations of DOC were measured with a Shimadzu total organic carbon analyser (TOC-V CSN). The instrument was performed in non purgeable organic carbon (NPOC) mode. Calibration curves were generated and run before sample analysis using a standard solution of potassium hydrogen phthalate  $C_6H_4(COOK)(COOH)$ . Each sample after an acidification with HCl was determined with three to four replicates with coefficient of variations <2%. To check the performance of the instrument and to ensure the data quality, ultra-pure water (Milli-Q, Millipore) and certified reference waters (Environment Canada, ANALAB) were measured during each analysis sequence.

The UV-visible absorption measurements were made on a Jasco V-560 spectrophotometer over a wavelength region of 210–700 nm with a 1 cm path length quartz cuvette (Hellma). The absorbance spectrum of ultrapure water blank was subtracted from samples absorbance spectra. The measured absorbance at wavelength  $\lambda$  was converted to the absorption coefficient  $a$  ( $m^{-1}$ ) according to the relationship:

$$a_{\lambda} = 2.303 * A_{\lambda}/L$$

Where  $A_{\lambda}$  is the absorbance and L is the path length of the optical cell in meter (here 0.01m).

The absorbance measurement provided information on chromophoric dissolved organic matter (CDOM) properties using four absorbance indices as described in Table VI-2.

### *b Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)*

AF4 was run in order to determine the molecular weight distribution of DOM. The system used was an Eclipse 3 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany) equipped with a trapezoidal separation channel (14.5 cm in length and 0.6 and 2.1 cm in width). Flows were controlled using an Agilent Technologies 1200 series isocratic pump with a micro-vacuum degasser. A UV/Visible detector (Agilent Technologies, 12000 series) set at 254nm was used (UV254). The experimental conditions were optimized to especially analyze natural aquatic DOM. The mobile phase was a 5 mM phosphate buffer ( $NaH_2PO_4$ ;  $Na_2HPO_4$ ) at pH 7.2. A 490  $\mu m$  spacer and a semi-permeable polyether sulfone (PES) membrane with a 1 kDa molecular weight cut-off were used in the channel. Constant flows were set at  $1ml.min^{-1}$ ,  $3mL.min^{-1}$  and  $0.2mL.min^{-1}$  for the detector flow, cross flow and inject flow respectively. The injection volumes were 1mL for natural samples and 100 $\mu L$  for standard solutions. Two calibrations per day were carried out with 8 organic molecules (Vitamin B12: 1.35 kDa; Aprotinin: 6.5 kDa; Cytochrom C: 12.4 kDa; Lysosym: 14.3 kDa; Myoglobin: 17 kDa; Carbonic anhydrase: 29 kDa; Albumin: 44.28 kDa;

BSA: 66.5 kDa purchased from Sigma-Aldrich). Using this calibration method, two DOM apparent molecular weights (AMW) were then calculated per day for each sample and averaged.

### *c Statistical analyses*

Statistical tests discussed in this work (unpaired t-test, one-way ANOVA, linear correlation and regression, Pearson correlation) were conducted with SigmaPlot for Windows Version 12.0. Statistical significance was set as  $p < 0.05$ . Statistical tests (Principal Analysis Component) and hierarchical clustering were performed with the R statistical software (R version 2.15.3, R Core Team, 2013).

*Table VI-2: Definition and significance of the CDOM indices from absorbance analysis*

<b>Absorbance indices</b>	<b>Calculation</b>	<b>Description</b>
<b><math>a_{254}</math></b>	Absorption coefficient at wavelength 254 nm ( $m^{-1}$ )	Tracer of chromophoric DOM distribution
<b><math>S_{275-295}</math></b>	Spectral slope of the wavelength region 275-295nm. Calculated using linear regression of the log – transformed spectra of the absorption coefficients	Information on DOM molecular weight and the influence of terrigenous DOM inputs. Negatively correlated with DOM molecular weight (Chin et al., 1994; Fichot and Benner, 2012; Helms et al., 2008)
<b>SR</b>	The ratio of the spectral slope of the shorter wavelength region (275–295 nm) to that of the longer wavelength region (350–400 nm) using the non-linear regression technique (Stedmon et al., 2000)	An indirect measure of the average molecular weight (AMW) of DOM Low values ( $SR < 1$ ) indicate higher AMW High values ( $1 < SR < 2$ ) indicate lower AMW (Helms et al. 2008)
<b>SUVA<sub>254</sub></b>	The sample UV absorbance at 254 nm divided by the DOC concentration measured ( $L.mgC^{-1}.m^{-1}$ )	A higher number is associated with greater aromatic content (Weishaar et al., 2003)

### III Results and discussion

#### 1 Environmental data and DOC concentration

In the four different sites downstream, the salinity was clearly dependent on the tide; high tide was characterized by highest salinities, ebb tide by mid salinities and low tide by lowest salinities. No significant difference was found between surface and bottom samples ( $p=0.583$ ) in the four sites downstream (La Carosse, Honfleur, Fatouville and Tancarville). In La Carosse, Honfleur, Fatouville, Tancarville and the transect salinities ranged from 33 to 0 with averages respectively at  $32 \pm 1$ ,  $10 \pm 10$ ,  $8 \pm 8$ ,  $0.5 \pm 0$  and  $0 \pm 0$ . Significant differences ( $p<0.01$ ) were found between the transect in the fluvial estuary and the four sampling sites downstream (La Carosse, Honfleur, Fatouville and Tancarville), between La Carosse and Honfleur, Fatouville, Tancarville and the transect and between Honfleur and Tancarville.

The DOC concentration ranged between  $2.73 \pm 0.03$  to  $2.41 \pm 0.03$   $\text{mg.L}^{-1}$  in the fluvial estuary (transect) with an average of  $2.51 \pm 0.08$   $\text{mg.L}^{-1}$ , from 3.14 to 2.52  $\text{mg.L}^{-1}$  with an average of  $2.79 \pm 0.24$   $\text{mg.L}^{-1}$  in Tancarville, from 3.27 to 1.85  $\text{mg.L}^{-1}$  with an average of  $2.7 \pm 0.54$   $\text{mg.L}^{-1}$ , from 2.73 to 1.74  $\text{mg.L}^{-1}$  with an average of  $2.38 \pm 0.43$   $\text{mg.L}^{-1}$  and from 1.41 to 1.10 with an average of  $1.21 \pm 0.11$   $\text{mg.L}^{-1}$  (Figure VI-2). No significant difference of the averaged DOC abundance were observed between Tancarville, Fatouville, Honfleur and the fluvial estuary locations, while in La Carosse, in the coastal area, DOC was significantly lower compare to the transect sites, Tancarville, Fatouville and Honfleur ( $p<0.01$ ). Potentially due to the dilution of river inputs in the coastal area, DOC concentrations were reduced from the fluvial to the lower estuary. Moreover, no significant difference was found between surface and bottom samples ( $p=0.729$ ) in the four sites downstream (La Carosse, Honfleur, Fatouville and Tancarville). The comparison of the individual samples between surface and bottom in the water column showed differences during the tidal cycle with high values in surface for Fatouville whereas in La Carosse and Honfleur bottom water samples presented higher values. In Fatouville surface samples presented higher DOC values during the high and low tides while in ebb tide bottom samples exhibited the highest DOC content.

These results were in accordance with previous studies on DOC in estuaries (Abril et al., 2002; Asmala et al., 2012; Yasui et al., 2016). The regression analysis between DOC concentration and salinity (Figure VI-2 A;  $R^2= 0.86$ ) suggested that a conservative model occurred along the estuary.

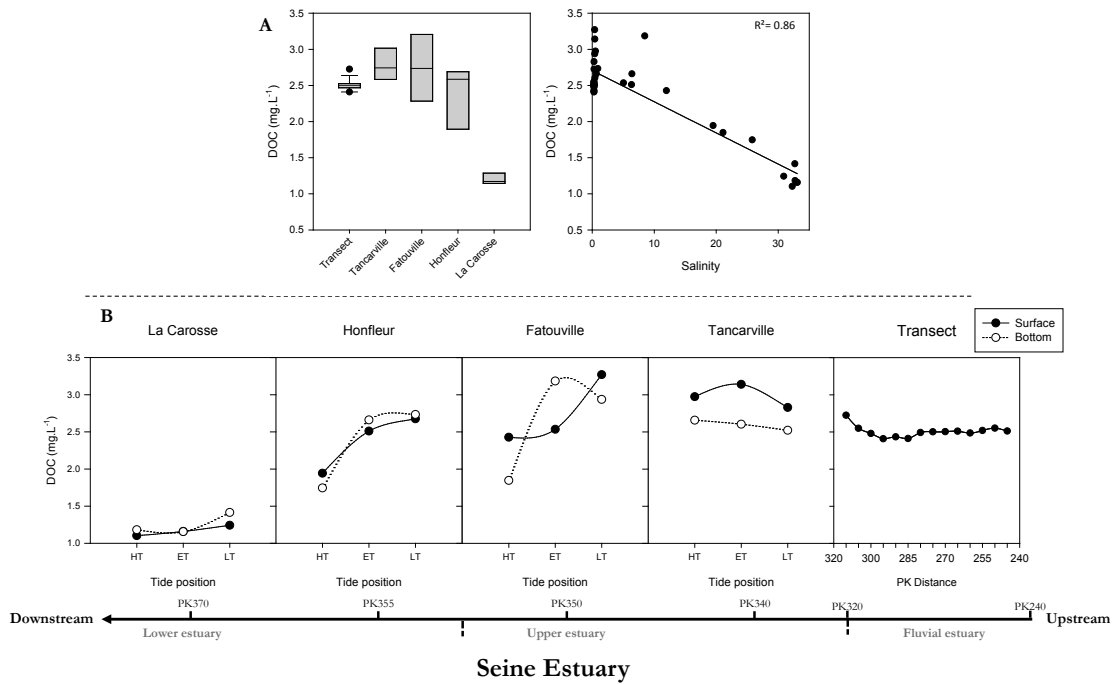


Figure VI-2: (A) DOC concentration vs. the five sites, salinity; (B) DOC concentration distribution vs. tide position for each sites

## 2 Variations in CDOM characteristics

The absorption coefficient at 254 nm ( $a_{254}$ ) ranged from 16.1 to 21.7  $m^{-1}$  (average  $17.7 \pm 1.3 m^{-1}$ ) along the transect, from 17.3 to 19.8  $m^{-1}$  (average  $18.2 \pm 1 m^{-1}$ ) at Tancarville, from 11.5 to 20.6  $m^{-1}$  (average  $17.6 \pm 3.3 m^{-1}$ ) at Fatouville, from 11.5 to 22.5  $m^{-1}$  (average  $17.7 \pm 4.6 m^{-1}$ ) at Honfleur and from 3.8 to 7.3  $m^{-1}$  (average  $5.6 \pm 1.5 m^{-1}$ ) at La Carosse (Figure VI-3 A). No significant difference of the  $a_{254}$  index between the three sites in the upper estuary (Honfleur, Fatouville and Tancarville) and the sites along the fluvial estuary was observed while significant differences were observed between La Carosse and all the other locations ( $p < 0.001$ ). Relative significant linear regressions between  $a_{254}$  and salinity ( $r^2 = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ; Figure VI-3 B) and between  $a_{254}$  and DOC concentration ( $r^2 = 0.84$ ,  $p < 0.001$ ; Figure VI-3 C) suggested that at least a part of the terrestrially derived DOM influenced the estuary with a tendency of conservative mixing behavior (Figure VI-3).

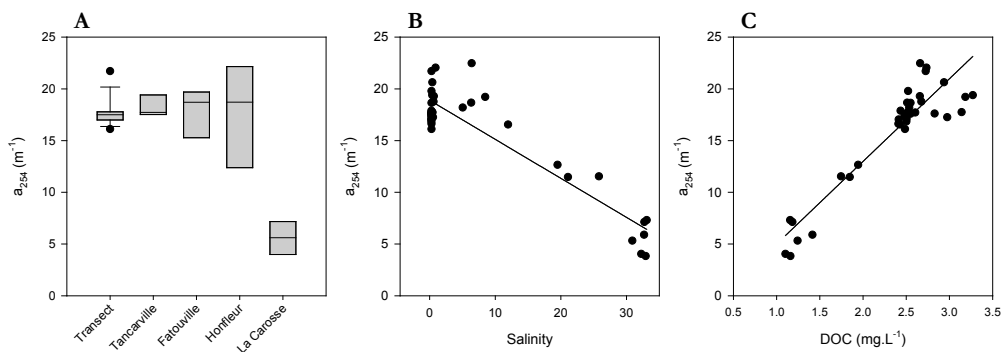


Figure VI-3: Absorbance at 254nm ( $m^{-1}$ ) vs. (A) the four sites and the transect, (B) salinity and (C) DOC ( $mg.L^{-1}$ )



The Seine River was a source of highly aromatic DOM, as indicated by elevated SUVA<sub>254</sub> values ranging from 2.81 to 3.46 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> (average 3.06 ± 0.15 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>) obtained for the more upstream sites, which informed about the input from the fluvial estuary in the lower and upper estuaries. SUVA<sub>254</sub> values ranged from 2.45 to 3.41 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> (average 2.87 ± 0.37 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>) in Tancarville, from 2.57 to 3.12 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> (average 2.84 ± 0.23 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>) in Fatouville, from 2.83 to 3.67 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> (average 3.19 ± 0.34 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>) in Honfleur and from 1.44 to 2.74 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> (average 2 ± 0.54 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>) in La Carosse (Figure VI-4 A). As for a<sub>254</sub>, no significant difference of SUVA<sub>254</sub> between the three sites in the lower and upper estuary (Honfleur, Fatouville and Tancarville) and the locations in the fluvial estuary was observed, while significant differences were observed between La Carosse and all the other sampling sites (p<0.001; Figure VI-4 A).

Higher SUVA<sub>254</sub> and a<sub>254</sub> values were found in the fluvial (Transect) and upper estuary (Tancarville, Fatouville and Honfleur) possibly associated with higher inputs of allochthonous DOM from terrestrial and/or anthropogenic sources. And consistent with previous observations (Benner and Kaiser, 2011; Fichot and Benner, 2012; Hernes and Benner, 2003), the concentrations of aromatic compounds correlated with CDOM.

Bulk DOM molecular weight in the estuary seemed to be affected by processes other than river-ocean mixing, as no distinct relationship with salinity gradient along the estuary was observed for S<sub>275-295</sub> and spectral slope ratio (SR). No significant difference between the fluvial estuary and the four sites downstream was observed for S<sub>275-295</sub> (Figure VI-4 B). The S<sub>275-295</sub> variation followed the same trend as DOC with an absence of DOM degradation in the fluvial and upper estuaries. The homogeneity along the fluvial and upper estuaries appeared to indicate low *in situ* processes such as production and microbial and photochemical degradation that were non-uniformly affecting DOM along the Seine estuary at that period of sampling. It is likely that the estuary was separated in the specific three parts, fluvial, upper and then lower. Values of S<sub>275-295</sub> ranged from 0.014 to 0.015 nm<sup>-1</sup> (average 0.014 ± 0.0002 nm<sup>-1</sup>) in the fluvial transect, from 0.013 to 0.015 nm<sup>-1</sup> (average 0.014 ± 0.0005 nm<sup>-1</sup>) in Tancarville, from 0.014 to 0.015 nm<sup>-1</sup> (average 0.014 ± 0.0004 nm<sup>-1</sup>) in Fatouville, from 0.013 to 0.015 nm<sup>-1</sup> (average 0.014 ± 0.0007 nm<sup>-1</sup>) in Honfleur and from 0.014 to 0.020 nm<sup>-1</sup> (average 0.017 ± 0.003 nm<sup>-1</sup>) in La Carosse (Figure VI-4 B).

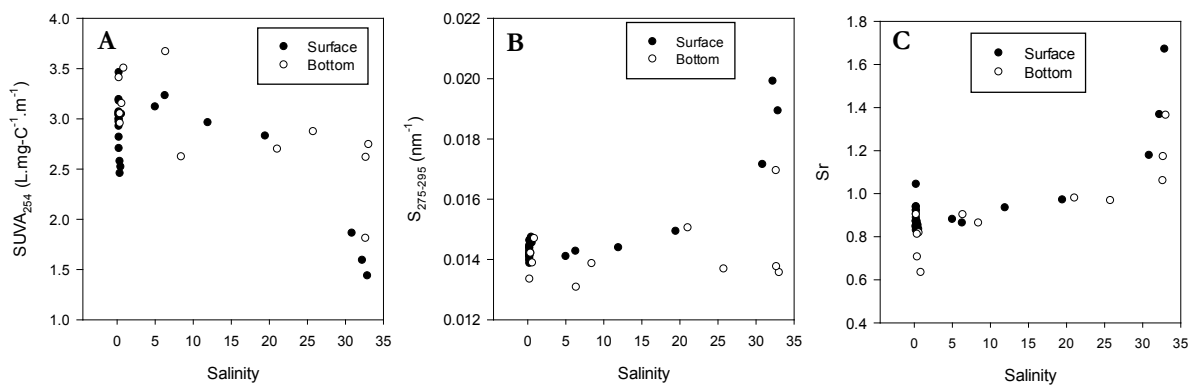


Figure VI-4: (A)  $SUVA_{254}$ , (B)  $S_{275-295}$  and (C)  $Sr$  vs salinity

The highest values of this spectral slope in the coastal zone indicated an overall lower molecular weight DOM pool. This trend could be due to a multitude of factors including dilution of terrestrial inputs, increased photodegradation and/or microbial degradation freshly produced DOM.  $S_{275-295}$  and SR increased generally in accordance with salinity (in particular in the mid-high salinity zone), probably due to the mixing of terrestrial and marine DOM. These results are similar to those obtained in the Jiulong Estuary and Delaware Estuary (Helms et al., 2008; Yang et al., 2013).

Regarding the SR index, La Carosse exhibited significantly higher values than the Transect, Tancarville, Fatouville and Honfleur ( $p < 0.01$ ). Lower SR values in the estuary indicated that the Seine River was also a source of higher molecular weight DOM. Values of SR did not show any significant differences between the Transect and the upper estuary, and ranged from 0.829 to 1.042 (average  $0.895 \pm 0.057$ ) in the transect, from 0.705 to 0.902 (average  $0.83 \pm 0.067$ ) in Tancarville, from 0.81 to 0.978 (average  $0.889 \pm 0.059$ ) in Fatouville, from 0.633 to 0.97 (average  $0.861 \pm 0.124$ ) in Honfleur and from 1.059 to 1.67 (average  $1.301 \pm 0.057$ ) in La Carosse (Figure VI-4 C). It seemed that the DOM MW distribution in the estuary was separated in two spatial zones, the first one with high allochthonous, aromatic and molecular weight DOM in the fluvial and upper estuary and then the lower estuary which can be characterized by degraded DOM and fresh autochthonous material with lower molecular weight and aromaticity.

Moreover, DOC concentrations and all UV/Vis optical properties ( $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$ ,  $S_{275-295}$  and SR) showed great differences between La Carosse and all the other sampling sites. This indicated that the abundance, quality and composition of DOM did not vary linearly along the estuary. The DOM pool in the fluvial and lower estuaries did not change with more aromatic, chromophoric characters and high molecular weights.

No correlation was found between these four UV/Vis indices, DOC concentration and salinity of the individual samples from all sites, while negative correlations were found between the SR and  $a_{254}$  and

also between  $SUVA_{254}$  and  $S_{275-295}$  with a Pearson's rank correlation coefficient,  $r_s$ , respectively at -0.551 and -0.512.

By using salinity as a river-ocean mixing index along the estuary, it was possible to follow the relative importance of each source on the DOC dynamics. Generally a conservative mixing estuary DOC gives a linear relationship between DOC and the salinity gradient. In the lower and upper Seine estuary, DOC was negatively correlated to the salinity with a Pearson's rank correlation coefficient  $r_s$  at -0.831 ( $p < 0.001$ ). This was consistent with trends observed in other studies (Bittar et al., 2016; Seidel et al., 2015; Yang et al., 2013).

Salinity was also negatively correlated to the  $a_{254}$  ( $r_s = -0.533$ ;  $p < 0.01$ ) and positively correlated with the spectral slope ratio ( $r_s = 0.589$ ;  $p < 0.01$ ), while  $SUVA_{254}$  and  $S_{275-295}$  were not correlated to DOC or/and salinity. All of these results appeared to indicate that this estuary did not have a conservative mixing behavior. A non-linear relationship can arise through non-conservative behavior but can also reflect the existence of additional sources external to the estuarine water column and autochthonous production in the estuary. Moreover the coastal area (La Carosse) was clearly different in terms of DOC, salinity,  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and SR.

The comparison of the individual samples from all sites and between surface and bottom in the water column did not show significant difference.

### 3 Molecular weight distribution along the estuary gradient

The DOM AMW distribution at the four sites from the lower and upper estuaries during a half tidal cycle (high tide, ebb tide and low tide) and along the transect in the fluvial estuary was determined using AF4. Results (Figure VI-5 A) showed significant differences along the estuary and the AMW trends were consistent with that observed for CDOM and DOC. The transect in the fluvial estuary was characterized by significant higher sizes ( $p < 0.01$ ) with average at  $2572 \pm 118$  D. La Carosse in the lower estuary showed significantly lower AMW with average at  $1600 \pm 7$  Da. In the upper estuary, no significant difference in the AMW distribution was found between Honfleur, Fatouville and Tancarville with average at  $2041 \pm 348$  Da,  $2131 \pm 330$  Da and  $2254 \pm 24$  Da respectively. Nevertheless Honfleur and Fatouville presented the highest MW variations during the tidal cycle, with AMW differences between high tide and low tide of, respectively, 852 Da and 792 Da. Bulk DOM molecular weight in this part of the estuary appeared to be strongly affected by processes during the tidal cycle as river-ocean mixing and/or autochthonous production.

This results are consistent with the molecular weight distribution trends observed in other studies in marine and estuarine environments, with clear MW variations between the terrestrial and marine end-members in an estuary (Hassellöv, 2005; Stolpe et al., 2014, 2010a; Zanardi-Lamardo et al., 2002).

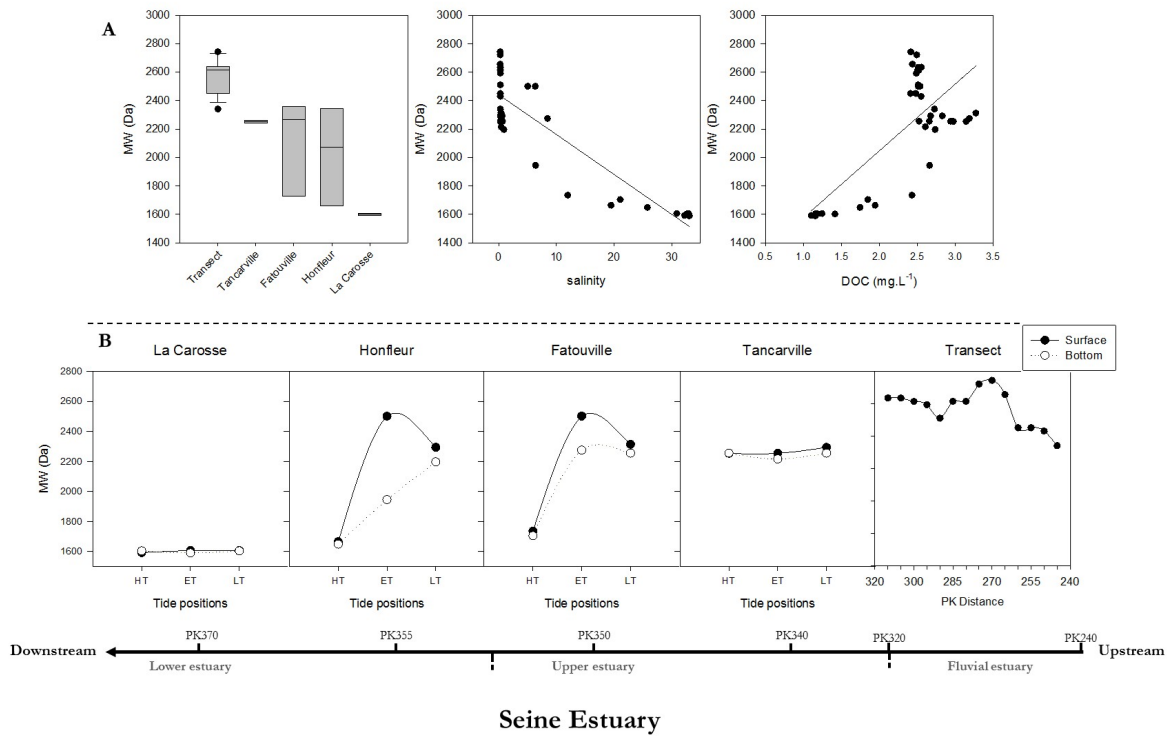


Figure VI-5: (A) Molecular weight distribution vs. the four sites and the transect, salinity and DOC (mg.L-1); (B) Molecular weight distribution vs. tide position for each sites

DOM AMW distribution during the tidal cycle thus showed significant differences in Honfleur and Fatouville sites. From the high tide (HT) to the ebb tide (ET) the DOM AMW increased and then decreased from the ET to the low tide (LT). The AMW of DOM appeared to be affected by the river-ocean mixing caused by the tide. A negative correlation ( $p < 0.001$ ) was found between the DOM AMW and salinity of the individual samples from all sites with a Pearson's rank correlation coefficient,  $r_s$ , of  $-0.87$ . This negative correlation confirmed the trends of a relationship between tidal cycle (salinity change) and the decrease of the DOM AMW which could be linked to processes as ocean-river mixing and/or flocculation.

#### 4 Statistical analysis of samples from the river-to-ocean continuum

Previous studies have detailed and explained mixing processes of water in different estuaries (DeVilbiss et al., 2016; Guo et al., 2007; Uher et al., 2001; Zhou et al., 2016). In order to illustrate our observations and to better understand the dynamics of DOM in the Seine estuary, principal component analysis (PCA) was performed using three qualitative variables (depth in the water column, sites and tide

periods) and six quantitative variables (salinity, DOC concentration, CDOM indices ( $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and SR) and the DOM molecular weight (MW); Figure VI-6).

The first two principal components accounted for 81.05 % (Dim 1) and 8.85 % (Dim 2) of the total variance, respectively (Figure VI-6). The two principal components thus already accounted for 89.9 % of the whole variance, which permitted to explain the variation tendencies of the different parameters. Based on the weight of the contribution of each variable in the PCA, the DOM molecular weight (MW), aromatic moieties ( $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$ ) and DOC concentration displayed high positive contributions (correlation > 0.8) in the Dim 1 whereas salinity and SR showed negative contributions (correlation < - 0.8) in the Dim 1 (Figure VI-6 A). Dim 2 showed a positive correlation (correlation > 0.5) for the  $SUVA_{254}$  associated with aromatic characters while a little negative correlation (correlation = -0.4) with DOM AMW. The scores plot (Figure VI-6) showed six significantly different clusters. The clusters 1 and 2 grouped samples from La Carosse in the coastal zone. Cluster 3 gathered Honfleur and Fatouville samples at high tide (surface and bottom). Clusters 4 and 6 included respectively Fatouville and Tancarville samples at surface and Honfleur, Tancarville and Fatouville samples at bottom, regardless of the tidal cycle. And cluster 5 grouped samples from the Transect. In the negative part of the Dim 1, clusters 1, 2 and 3 were regrouped and characterized by low values of AMW, aromaticity and DOC, high salinities and SR. These clusters were composed by all samples collected from La Carosse and high tide samples from Honfleur and Fatouville (surface and bottom waters), these samples can thus be described as marine-like samples. In the positive part of the Dim 1, the samples were disposed vertically, along the Dim 2, bottom samples at the top, the transect samples around 0 and the surface samples down (Figure VI-6 B).

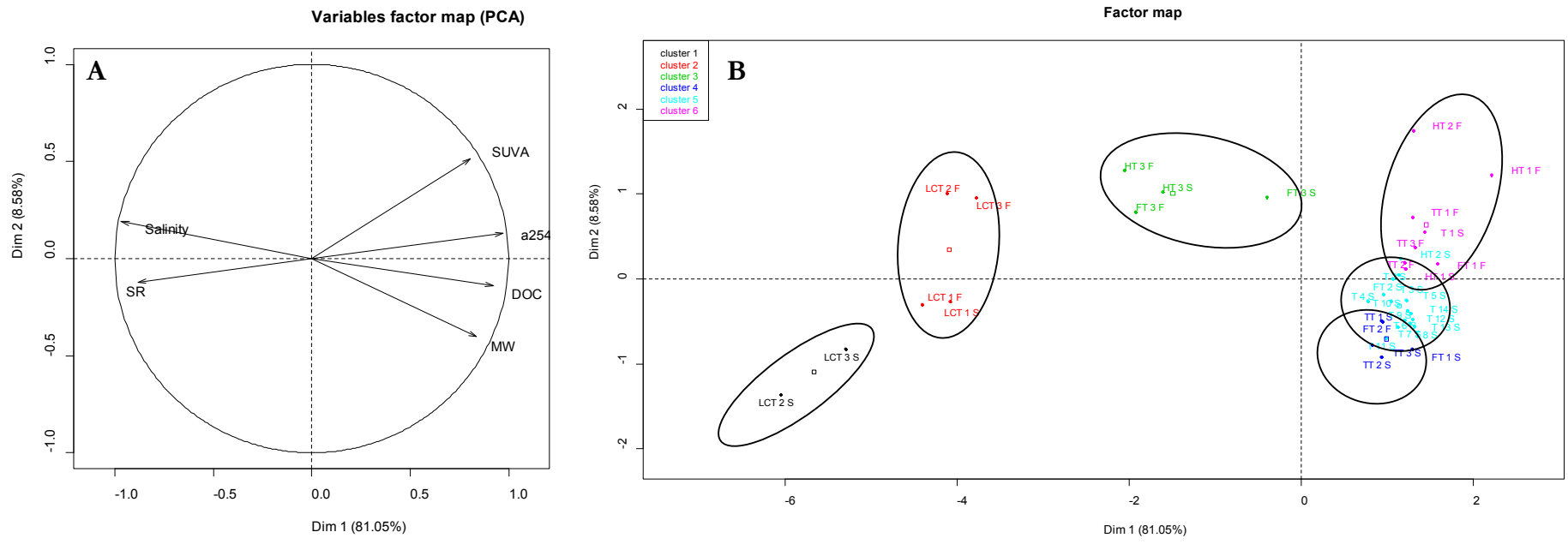
This PCA suggested three specific zones and processes. The sample La Carosse was really different with specific marine DOM characteristics (low MW, aromaticity and DOC). In the Honfleur and Fatouville sites whatever the sampling depth the tide effect was clear with significant differences between HT and LT samples. HT samples were characterized by low MW, aromaticity and DOC, while for Tancarville, the fluvial transect and Fatouville/Honfleur at ET/LT, the PCA results showed more terrestrial DOM characteristics with differences between sampling depths. Finally the PCA coupled with a Pearson's rank correlation test on all the individual samples from the upper and lower estuary (Tancarville, Fatouville, Honfleur and La Carosse;  $n=24$ ) permitted to define the first principal component (Dim 1) as a descriptor of the mixing and processing of DOM along the estuary. The second principal component (Dim 2) cannot be correlated with specific variables but permitted to separate, in the lower estuary, the depth of the samples with a major relation with aromaticity (SUVA). The DOM variability along the river-to-ocean continuum in April 2016 was thus mainly explained by the input of terrigenous

DOM from the Seine River as indicated by the high statistical significance of salinity, DOC, SUVA,  $a_{254}$  and MW (Figure VI-6 C).

Moreover the AF4 AMW measurement of DOM appeared to be a good indicator of DOM dynamics because of the high correlations with other descriptors (salinity, DOC,  $a_{254}$  and SR) and this strengthened the importance of determining the evolution of molecular size in studies dealing with DOM dynamics. This approach confirmed the analytical results showing spatiotemporal variations of DOM characteristics clearly influenced by the tide. All of these results could not, however, allow us to conclude about the real involved processes during river-ocean mixing but revealed a near-conservative mixing model with some removal processes along the salinity gradient. These results, obtained for the wintry period studied in this work, must be completed by the study of seasonal variations of the DOM descriptors distributions.

Besides physical dilution, biological processes such as bacterial and microbial activity can take place through the river-to-ocean continuum including changes in the DOM composition. Physical dilution along the estuary is known to be a great driver of DOM variability in river-estuary system (Bauer and Bianchi, 2011; Bianchi et al., 2004; Seidel et al., 2015). The strong correlation that we observed between DOM variability and DOC concentration, MW, aromaticity and salinity therefore supported the fact that the dilution of terrestrial material in marine waters is a significant driver for DOM variability in the Seine estuary as for Amazon or Mississippi rivers (Medeiros et al., 2015; Zhou et al., 2016). In the coastal zone, La Carosse, in comparison with the three other sites in the upper and lower estuaries, presented negative deviations from the dilution of riverine DOM, which could suggest quantitative removal within the mouth of the estuary (Figure VI-2; Figure VI-3; Figure VI-5). Averaged DOC concentrations were 52% lower in the coastal zone (Figure VI-2). In a turbid estuary the photo-degradation is considered to be a minor process in DOC transformation. The possible DOC and MW removal downstream MTZ could be the flocculation of DOM with increasing salinity (Sholkovitz et al., 1978) and degradation by microbial pump (Herlemann et al., 2014; Hernes and Benner, 2003; Miller and Moran, 1997). Amongst the environmental parameters considered in this work, DOM was primarily predicted by salinity and displayed autochthonous or marine characteristics, particularly regarding SUVA<sub>254</sub>, DOC and MW distributions as previously reported (Jaffé et al., 2008; Vazquez et al., 2010). In Fatouville and Honfleur at high tide and in La Carosse, the relatively lower levels of SUVA<sub>254</sub> (2.8 L.mg-C<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> and lower), DOC (2.4 mg.L<sup>-1</sup> and lower) and MW (1735 Da and lower) suggested that the DOM was predominantly produced in situ (autochthonous DOM) or imported from coastal waters. The fluvial and upper estuaries were characterized by high DOC concentrations and CDOM properties (Figure VI-2; Figure VI-3; Figure VI-5) resulting from terrestrial inputs from the Seine watershed (mostly agricultural and urban). Indeed, a significant negative correlation between CDOM ( $a_{254}$ ) and salinity in

the Seine estuary ( $r^2=-0.739$ ,  $p<0.001$ ; Supplementary information 2) highlighted a terrigenous source for DOM, and a relative conservative river-ocean mixing of DOM along the estuary. This relatively linear relationship in the lower estuary (for Honfleur, Fatouville and Tancarville sites) during this wintry period indicated a major terrestrial origin of DOM and weak in situ sources.



C	Salinity	DOC	MW	a254	SUVA	SR	Variance	% of variance	Cumulative % of variance
Dim.1	-0.9679632	0.9226424	0.8374556	0.9717775	0.8070604	-0.8820646	4.863	81.055	<b>81.055</b>
Dim.2	0.1894265	-0.1394456	-0.4028689	0.1289251	0.5152924	-0.122715	0.515	8.581	<b>89.635</b>
Dim.3	-0.04842777	-0.28997058	0.34194241	-0.04857185	0.28617481	0.28281154	0.368	6.127	<b>95.762</b>

Figure VI-6: Results of principal component analysis (PCA). (A) Loading plots for PC1 and PC2. (B) Sample scores for the first two principal components. (C) Principal component loading in the different variables for the first three dimensions.



## IV Conclusions

In the present study we have shown that in the Seine estuary, changes in DOM can be accounted by taking into consideration complementary processes, principally the mixing between river and ocean waters. We presented a preliminary evaluation of the concentrations, sources and types of DOM in the Seine estuary using DOC concentrations, UV/Visible technique and DOM molecular weight distribution. Our results suggested that the main sources of DOM during the wintry studied period were freshwater inputs. The DOM concentrations were not only influenced by sources strength but also by the hydrology and estuarine processes. Significant changes in DOM properties were observed from the fluvial estuary until the English Channel. DOM removal in the estuary by processes such as flocculation and/or microbial activity and/or photodegradation were not really established, whereas in the coastal zone, DOM removal was significant although it was difficult to determine the involved processes. The application of statistical processing was successful, and showed significant differences in DOM characteristics between the sampling sites. While the CDOM parameters were relevant to discriminate between the various sources of DOM, the AMW distribution was shown to be a very interesting indicator of the DOM dynamics. Although mostly of terrestrial origin, DOM properties were modified with a relatively conservative relationship in the Seine estuary at winter conditions. A clear shift from allochthonous (more terrestrial DOM) to autochthonous DOM seemed to indicate a change in the size, nature and type of the predominant DOM, and was different from the result of terrestrial DOM dilution.

For the coastal area, our results showed net differences in nature and size of DOM which could not be explained by the only simple dilution of terrigenous DOM through the estuary. Seasonal variations have now to be investigated in order to complete these preliminary results on DOM dynamics in the Seine estuary at winter conditions. This work nevertheless showed all the interest to take into account both the MW distribution and the optical properties of DOM to study its dynamics in complex estuarine ecosystems.

## Supplementary information

S1:

	<b>Salinity</b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	*	**	**	**
Tancarville		n.s.	*	*
Fatouville			n.s.	*
Honfleur				**

	<b>DOC</b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	n.s.	n.s.	n.s.	**
Tancarville		n.s.	n.s.	*
Fatouville			n.s.	**
Honfleur				**

	<b>a<sub>254</sub></b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	n.s.	n.s.	n.s.	**
Tancarville		n.s.	n.s.	**
Fatouville			n.s.	**
Honfleur				**

	<b>SUVA<sub>254</sub></b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	n.s.	n.s.	n.s.	**
Tancarville		n.s.	n.s.	*
Fatouville			n.s.	*
Honfleur				**

	<b>S<sub>275-295</sub></b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tancarville		n.s.	n.s.	n.s.
Fatouville			n.s.	n.s.
Honfleur				n.s.

	<b>SR</b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	n.s.	n.s.	n.s.	**
Tancarville		n.s.	n.s.	*
Fatouville			n.s.	*
Honfleur				*

	<b>Molecular weight</b>			
	Tancarville	Fatouville	Honfleur	LaCarosse
Transect	*	**	*	**
Tancarville		n.s.	n.s.	**
Fatouville			n.s.	**
Honfleur				*

S2: Spearman correlation coefficients between DOM parameters

	<b>DOC</b>	<b>MW</b>	<b>a<sub>254</sub></b>	<b>SUVA<sub>254</sub></b>	<b>S<sub>275-295</sub></b>	<b>SR</b>
<b>Salinity</b>	-0,831 **	-0,794 **	-0,739 **	n.s.	n.s.	0,81 **
<b>DOC</b>		0,773 **	0,78 **	n.s.	n.s.	-0,828 **
<b>MW</b>			0,721 **	n.s.	n.s.	-0,722 **
<b>a<sub>254</sub></b>				0,755 **	n.s.	-0,771 **
<b>SUVA<sub>254</sub></b>					-0,634 **	-0,534 *
<b>S<sub>275-295</sub></b>						n.s.

Significant coefficients \* p < 0.01 and \*\* p < 0.001 are shown, n.s. = not significant.



# Seasonal dynamic of dissolved organic matter of the Seine estuary using multiple analytical and statistical approaches

To be submitted to *Water Research*

## Abstract

The estuaries represent transitional and unique ecosystems, unlike any other on Earth, where the freshwater from rivers and streams mix with the salt water of the ocean to create a brackish water zone. The Seine estuary is the link between terrestrial inputs from the Seine River and the English Channel. This study focused on the variations of dissolved organic matter (DOM) characteristics along this continuum. The aim was to better understand the seasonal variability of DOM properties in this peculiar estuary by using various variables and descriptors. For this purpose, environmental parameters like water temperature, river discharge and salinity were confronted to the DOM properties dataset. This dataset was obtained using DOM characterization techniques, UV/Vis spectrophotometry, fluorescence (Excitation-Emission Matrix (EEM)) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). Different statistical approaches were then applied to better understand the dynamics and the factors influencing the DOM, Spearman correlation, model of linear regression (MLR), Parallel Factor Analysis (PARAFAC) and self-organizing maps (SOM).

This work, conducted on samples collected in summer 2015 and winter 2016 in the Seine estuary showed a clear seasonal effect on DOM properties. A spatiotemporal variability of DOM characteristics was thus highlighted and especially the SOM revealed some specificity by seasons, sites or tide periods with a greater influence of the terrestrial inputs in winter and also an apparition of a potential pulp mill signature in summer.

## Keywords

Biogeochemistry, Dissolved organic matter; Estuary; Self organizing maps; EEM spectroscopy; PARAFAC; optical properties

## V Introduction

Dissolved organic matter (DOM) is heterogeneous in aquatic ecosystems in terms of range of molecular weights, chemical characteristics and structures. These molecules play a multifunctional and key role in a broad range of processes and biogeochemical cycles in aquatic environments, influencing carbon dynamics, nutrient availability, biological activities (phytoplankton and microbial growth) and generally the ecosystem productivity. DOM represents an important and dynamic pool of carbon and also active and reactive components in aquatic ecosystems. River inputs contribute, through the DOM, to the transfer of amounts of dissolved organic carbon (DOC), trace elements and nutrients to the sea (Meybeck, 2003) which may affect water quality and the primary production in estuaries and continental shelves (Boesch et al., 2009). The transport, reactivity and evolution of elements coupled to the relation between size and type of molecules or colloids along the river-ocean continuum are poorly understood. Aquatic organic matter, dissolved, colloidal and particulate, characterized by a size of 1nm-100µm, can be considered as highly dynamic along a salinity gradient with many different interactions with organic and/or inorganic compounds (Guo and Santschi, 1997; Stolpe et al., 2010a; Wilkinson et al., 1997).

Continuums from river to the ocean, as the Seine estuary, are characterized as regions of transitions from watersheds with freshwater to oceans with sea-water. Many different processes controlled fluxes in estuarine systems, either physical processes like river discharges, tide effects, resuspension/sedimentation or biological and chemical processes as particulate and dissolved organic matter production degradation, alteration. Furthermore in urban water systems, rivers can be the vector of pollutants with a strong chemical control from DOM, influencing their solubility, transport and bioavailability (Aiken et al., 2011; Ding et al., 2013; Maoz and Chefetz, 2010). Because estuaries are considered to provide a filtering service and thus auto-epuration, they represent important areas for humans, animals and plants.

The Seine estuary waters can be characterized as the final receptacle from a catchment area covering 12% of the area of France and more than 17 million people. They are also characterized by the presence of very high concentrations of suspended particulate matter (SPM) in the lower and upper estuaries. The Seine Estuary has then been studied to better understand the maximum turbidity zone (MTZ) (Deloffre et al., 2006; Garnier et al., 2008) associated with sedimentation and transportation processes and especially the origin and role of particulate organic carbon (Etcheber et al., 2007; Servais and Garnier, 2006). Moreover due to strong anthropogenic forcings, the presence of contaminants has also been largely investigated (Gonzalez-Rey et al., 2015; Hamzeh et al., 2013; Lesueur et al., 2015; Schnitzler et al., 2011).

DOM has been considered as the major component in aquatic systems such as estuaries with a cycle generally dominated, by a conservative mixing processes (C. Guéguen et al., 2011; Kowalczyk et al., 2010; Markager et al., 2011). However influences from different processes such as flocculation, resuspension, biological production or photobleaching and photochemical transformations can significantly modify the type of mixing (Alling et al., 2010; Guéguen et al., 2016; Tzortziou et al., 2007). In temperate regions, our understanding of the seasonal variations in the export of DOM accounting its composition, size and sources, is poor, in comparison to the knowledge on particulate organic matter and inorganic forms. Because of the DOM role in the estuaries, the coastal nutrients and biogeochemical budgets, a better understanding of the seasonal variations of DOM and dynamics in a major estuary is required. The improvement of the knowledge on seasonal effects on DOM dynamics is all the more crucial in the case of the highly anthropized watershed of the Seine estuary

On the other hand, it is important to better understand the relationship between the variations of environmental conditions and the variations of quality and quantity of exported DOM as well as its evolution and effects on marine systems.

The objectives of this work were to describe DOM properties in the Seine estuary, a temperate catchment area dominated by urban and agricultural activities. The temporal variations in DOM concentrations, quality, sources and size were also investigated according to the season, summer or wintry periods, using spectroscopic analyzes (UV/vis and fluorescence) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). Furthermore, different statistical approaches were used to study the DOM dynamics and evolution along the Seine estuary.

## VI Experimental

### 1 Study Site and Sampling Strategy

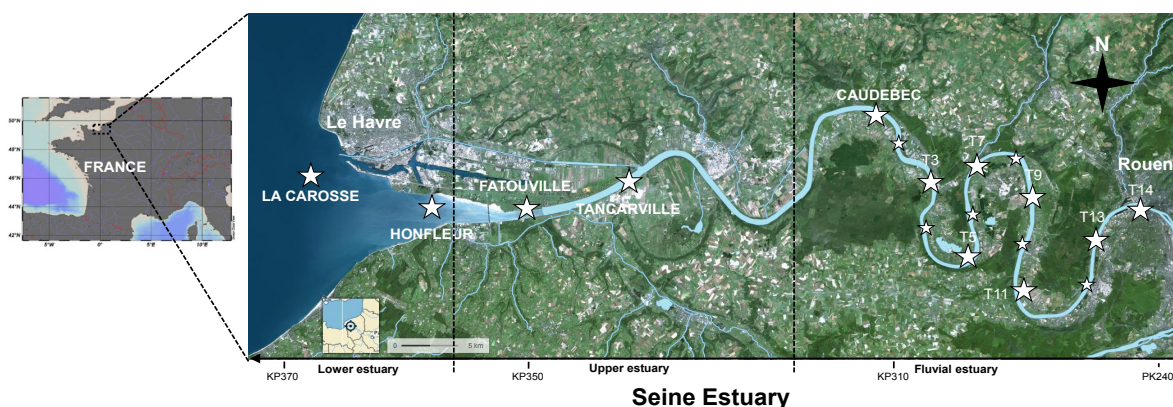


Figure VI-7: A map of the study area and sample locations in the Seine estuary (white stars: sampling point; KP: kilometric point, distance in kilometers from the city of Paris (KP 0))

This study was conducted in the Seine estuary (Figure VI-1), located in the north-western France. It is the largest macrotidal estuary flowing into the English Channel with an area of 150 km<sup>2</sup> at high tide. The Seine River, with a watershed area of 78 650 km<sup>2</sup>, leads to freshwater inputs into the estuary with an intra-estuarine watershed area of 11 500 km<sup>2</sup>. River discharges present large seasonal variations due to the oceanic climate, from a maximum of 2000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> in winter to a minimum of 100-200 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> in summer and with an average flow around 400-500 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>. Furthermore, the Seine estuary is characterized by a maximum turbidity zone (MTZ) in the upper estuary with suspended particulate matter concentrations higher than 1-2 g.L<sup>-1</sup> (Servais and Garnier, 2006). Moreover, because of its morphology coupled with regular dredging and the presence of embankments, marine waters can move farther in the upstream estuary.

Samplings were conducted during two contrasted seasons, summer and winter, on board the R/V Côtes de la Manche; The first campaign took place from the 26 to 29 September 2015 and the second one from the 23 to 26 April 2016. The climatic conditions were wintry during this second sampling period and the weeks before, even though having taken place in April. We thus think it was more pertinent to consider that the samples collected in April 2016 were more representative of the winter season. Surface and near bottom samples were collected along four sites in the Seine estuary. Honfleur (KP 355) was chosen as the lower estuary location in order to examine the inputs from marine water. Fatouville and Tancarville (KP 350 and 340) in the upper estuary were sampled to investigate mixing of river and ocean waters. As for the fluvial estuary, Caudebec (KP310) was collected in 2015, whereas in 2016 samples were collected along a transect from Caudebec to Rouen (KP245). For Honfleur, Fatouville, Tancarville and Caudebec sites, samples were taken at two depth levels and at three tide periods, during the high tide (HT), ebb tide (ET) and low tide (LT). That is thus six samples per site and per year (except for Caudebec in 2016) for a total of 42 samples. As for the transect from Caudebec to Rouen in 2016, 14 water surface samples were collected from the fluvial estuary. Water samples were filtered immediately after sampling through pre-combusted glass fiber filter (Whatman GF/F 0.70µm) and stored in the dark at 4°C until analyses.

### 3.DOM analysis

#### *a DOC analysis*

DOC concentrations were analyzed with a Shimadzu total organic carbon analyzer (TOC-V CSN). The instrument was performed in non purgeable organic carbon (NPOC) mode. Calibration curves were generated and run before sample analysis using a standard solution of potassium hydrogen phthalate C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOK)(COOH). Each sample after acidification with HCl 2M was determined with three to four



replicates with coefficient of variations <2%. Analysis integrity was tested daily and for each samples series by using certified reference materials (Environment Canada, ANALAB).

### *b Absorbance measurements and indices ( $a_{254}$ , $S_{275-295}$ , $SUVA$ and $SR$ )*

The absorbance spectra were acquired with a Jasco V-560 spectrophotometer throughout the UV-Visible domains on a wavelength region of 210–700 nm with a 1 cm path length quartz cuvette (Hellma). Ultrapure water (Milli-Q, Millipore) was used as a blank and subtracted from samples absorbance spectra. The measured absorbance at wavelength  $\lambda$  was converted to the absorption coefficient  $a$  ( $m^{-1}$ ) according to the relationship:

$$a_{\lambda} = 2.303 * A_{\lambda}/L$$

Where  $A_{\lambda}$  is the absorbance and  $L$  is the path length of the optical cell in meter (here 0.01m).

The absorbance measurements provided information on DOM properties using four absorbance indices (described in Table VI-2).

### *c Fluorescence analysis*

All fluorescence measurements were made with a Fluorolog FL3-22 (HORIBA Jobin Yvon) used to obtain the three-dimensional excitation-emission matrix (EEM) spectra of DOM samples. Samples were analyzed in a 1 cm path length fused silica cell (Hellma) and spectra were corrected for instrument biases using protocols suggested by the manufacturer. Subtraction of ultrapure water (Milli-Q, Millipore) blank spectra, recorded under the same conditions, eliminated Rayleigh and Raman scatter peaks and finally, EEMs were normalized to the area of an ultrapure water Raman peak measured at 350 nm excitation (Huguet et al., 2009; Lawaetz and Stedmon, 2009). Fluorescence intensities are then reported in Raman units.

The absorbance measurements were used to prevent the fluorescence data from inner-filtering effect. Indeed, absorbance spectra of samples were systematically recorded before analysis using spectrofluorometry and when the maximum of absorbance (250 nm in this study) was higher than 0.1, samples were diluted with ultrapure water in order to avoid inner-filter effects and then to guarantee a good linearity between fluorescence intensity and concentration of fluorophores (Huguet et al., 2009; Miller et al., 2010). Fluorescence spectra were collected at emission wavelengths from 260 to 700 nm and excitation wavelengths from 250 to 410 nm.

Two fluorescence indices and four fluorescence bands intensities were systematically calculated for water samples and used as described in Table VI-2.

A parallel factor analysis (PARAFAC) model was executed for fluorescence data processing using the DOM Fluor toolbox in Matlab version 7.10 (Stedmon and Bro, 2008) in order to determine the different fluorescent components contributing to EEM fluorescence spectra of the whole dataset. Outlier identification was performed using the OutlierTest command and no samples with extreme leverage were found in the EEMs dataset. Furthermore this model was run with non-negativity constraints. Three to eight components were computed for the EEMs dataset. The number of components was fixed by visual examination of the residuals from models (Stedmon and Bro, 2008). Here we reported the fluorescence intensities of the modelled components in Raman units (RU) (Murphy et al., 2010; Stedmon et al., 2003).

#### *d Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)*

DOM molecular weight distribution was determined using the AF4 coupled with UV/visible detector. The system used was an Eclipse 3 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany) equipped with a trapezoidal separation channel (14.5 cm in length and 0.6 and 2.1 cm in width). All flows were controlled using an Agilent Technologies 1200 series isocratic pump with a micro-vacuum degasser. The spectrophotometer detector UV/Visible (Agilent 1200 series) was set at 254nm. The separation conditions were especially optimized in order to determine the apparent molecular weight (AMW) of DOM. A mobile phase with 5 mM phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and pH 7.2 was used as well as a semi-permeable polyether sulfone (PES) membrane at 1 kDa (Alting) and a spacer at 490  $\mu\text{m}$  in the channel.

Respective constant flows at  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $0.2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  were set for the detector flow, cross flow and inject flow respectively. 1mL for natural samples and 100 $\mu\text{L}$  for standard solutions were injected in a 1mL sample loop. Two calibrations per day were carried out with 8 organic molecules (Vitamin B12: 1.35 kDa; Aprotinin: 6.5 kDa; Cytochrom C: 12.4 kDa; Lysosym: 14.3 kDa; Myoglobin: 17 kDa; Carbonic anhydrase: 29 kDa; Albumin: 44.28 kDa; BSA: 66.5 kDa purchased from Sigma-Aldrich). These two calibration curves permitted to calculate for each sample two AMW that were averaged.

### *e Self-organizing map (SOM)*

To explore the data set, the self-organizing map (SOM) algorithm (Kohonen, 2001) was used with a program file written by the authors (Giraudel and Lek, 2001). The SOM is a powerful method to classify complex data ruled by non-linear relationships. Recent applications of SOM in aquatic DOM have yielded very good results in patterning and prediction (Chea et al., 2016; Cuss and Guéguen, 2015; Ejarque-Gonzalez and Butturini, 2014; Huibin Yu et al., 2015). SOM can be applied directly on DOM descriptors and parameters coupled with a PARAFAC analysis of EEM fluorescence data.

The SOM analysis was performed on mean-centered data scaled to unit variance. The Kohonen network consists in two layers of neurons: the first layer (input layer) is connected to each vector of the data set -i.e. one vector is a real sample unit with 23 descriptors (variables)- and the second layer (output layer), which is the Kohonen map, forms a two-dimensional array of 60 neurons arranged on a hexagonal lattice (Figure VI-8). For this purpose, in each hexagon, a reference vector is considered. The reference vectors correspond to virtual sample units with descriptors to be computed. In the output layer, the units of the grid (virtual sample units) give a representation of the distribution of the real sample units in an ordered way.

A direct result of the SOM algorithm is a distribution of the samples on the SOM topological map. According to the properties of the algorithm, the samples that are in the same cell are very similar, and similar to those in neighboring cells.

The modifications of the virtual sample units are achieved through an artificial neural network (ANN) and computed during a training phase by iterative adjustments. For learning, only input units are used, no expected-output data is given to the system: this is referred to as an unsupervised learning. In this work, the parameters were chosen according to Kohonen's advice (Kohonen, 2001, chapter 3) as follows: flat rectangular maps were selected; the neighborhood kernel was described in terms of a Gaussian function; the number of iterations was 500 times the number of the map units with 2,000 iterations for the ordering phase of the learning.

Moreover, the values of the descriptors of each virtual sample unit were used to display the distribution of each variable on the organized map on which real samples were plotted. A gray shade gradient was used to represent the values of the descriptors. This two-dimensional representation can be considered as a "component sliced" version of the SOM.

Then, a classical clustering analysis of SOM output using Ward method was used. This method is applied to the results of the SOM model, or more precisely on the virtual sample units of the output layer.

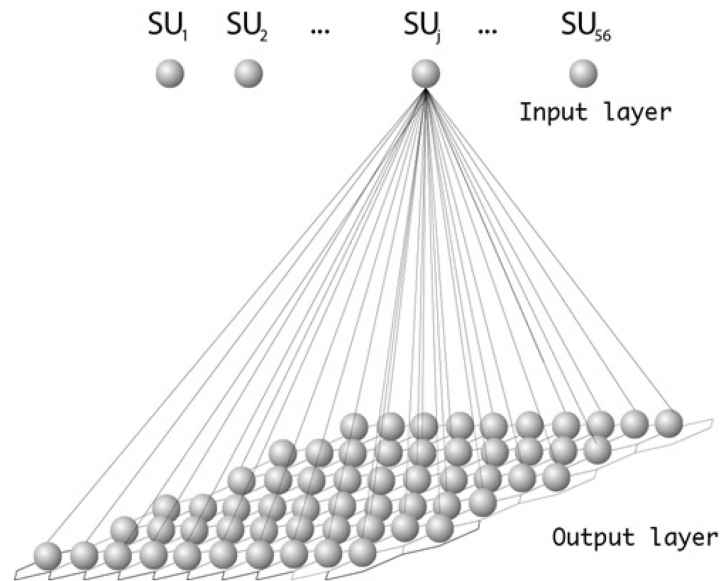


Figure VI-8: Representation of the unsupervised ANN approach with the Kohonen self-organizing map, showing the input neurons (real sample units) and the output neurons (virtual sample units) organized on a rectangular two-dimensional lattice. (Giraudel and Lek, 2001)

### *f Statistical analyses*

Statistical tests used in this study (unpaired t-test, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Multiple linear regression (MLR) models) were conducted with RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016, Inc) and Spearman's rank correlations were performed with SigmaPlot for Windows Version 12.0. Statistical significance was set as  $p < 0.05$ . MLR models were used to identify significant environmental predictors throughout the complete study period and then this specific approach was used to identify changes in environmental predictor(s) associated with hydrological shifts. The adjusted  $R^2$  values indicated the proportion of variation explained by MLR models.

Table VI-3: Definition and significance of the DOM indices from absorbance analysis

<b>Absorbance indices</b>	<b>Calculation</b>	<b>Description</b>
<b>a<sub>254</sub></b>	Absorption coefficient at wavelength 254 nm (m <sup>-1</sup> )	Tracer of chromophoric DOM distribution
<b>S<sub>275-295</sub></b>	Calculated using linear regression of the log – transformed spectra of the absorption coefficients in the wavelength region 275-295nm	Information on DOM molecular weight and the influence of terrigenous DOM inputs. Negatively correlated with DOM molecular weight (Chin et al., 1994; Fichot and Benner, 2012; Helms et al., 2008)
<b>SR</b>	The ratio of the spectral slope of the shorter wavelength region (275–295 nm) to that of the longer wavelength region (350–400 nm) using the non-linear regression technique (Stedmon et al. 2000)	An indirect measure of the average molecular weight (AMW) of DOM Low values (SR < 1) indicate higher AMW High values (1 < SR < 2) indicate lower AMW (Helms et al. 2008)
<b>SUVA</b>	The sample UV absorbance at 254 nm divided by the DOC concentration measured (L.mgC <sup>-1</sup> .m <sup>-1</sup> )	Proxy for aromaticity A higher number is associated with greater aromatic content (Weishaar et al. 2003)
<b>Fluorescence indices/bands</b>	<b>Calculation</b>	<b>Description</b>
<b>Biological Index (BIX)</b>	Ratio I380/I430 between fluorescence intensity at 380 nm and 430 nm in emission, at 310 nm excitation wavelength.	Values between 0.8 and 1.0 correspond to freshly produced DOM of biological or microbial origin, whereas values below 0.6 are considered to contain allochthonous OM (Huguet et al. 2009).
<b>Humification Index (HIX)</b>	Ratio of the emission spectrum areas between 300–345 nm and 435–480 nm in emission at 254 nm excitation wavelength	Estimated the degree of humification of DOM (linked to aromaticity) based on fluorescence analysis (Zsolnay et al., 1999)
<b>α</b>	Excitation: 350-370 nm Emission: 420-480 nm	Humic like substances (Huguet et al., 2009; Parlanti et al., 2000)
<b>α'</b>	Excitation: 250-260 nm Emission: 400-480 nm	Humic like substances + recent materials (Huguet et al., 2009; Parlanti et al., 2000)
<b>β</b>	Excitation: 310-320 nm Emission: 370-410 nm	Biological and microbial materials Autochthonous production (Huguet et al., 2009; Parlanti et al., 2000)
<b>γ</b>	Excitation: 270-280 nm Emission: 300-350 nm	Protein-like material (Huguet et al., 2009; Parlanti et al., 2000)

## VII Results and discussion

### 1 Environmental data and DOC concentration

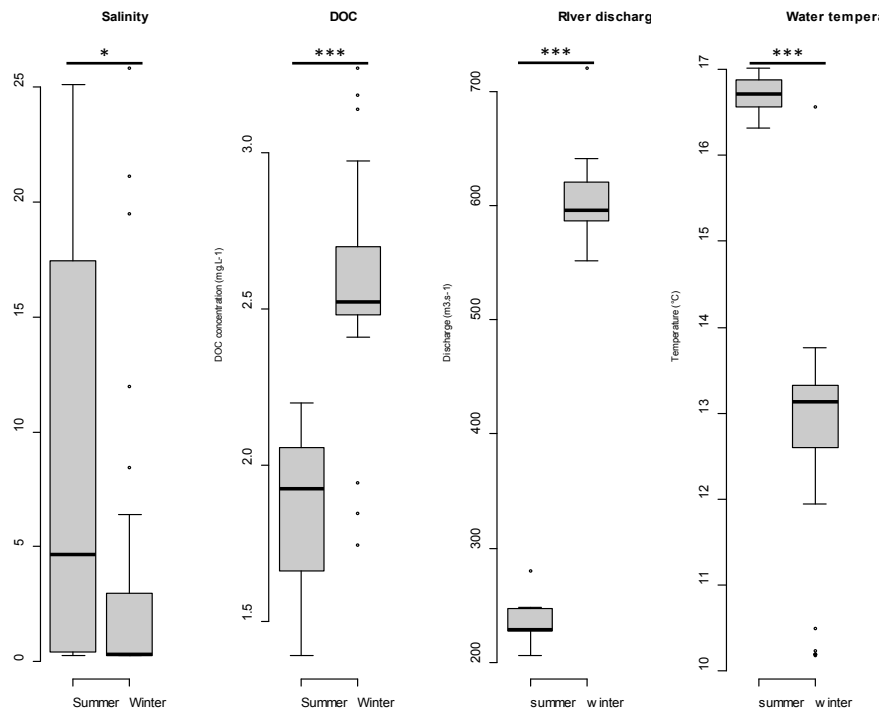


Figure VI-9: Box plots comparing salinity, DOC concentration, river discharge and water temperature between summer 2015 and winter 2016

Environmental characteristics are summarized in Figure VI-9. The salinities of the Seine estuary in September 2015 and April 2016 averaged respectively at  $8.7 \pm 8.9$  and  $3.5 \pm 3.5$  and ranged respectively from 0.3 to 25 and 0.3 to 26. River discharges (Banque HYDRO) were respectively around  $213 \pm 41$  and  $751 \pm 184 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  and water temperature averaged at 16.7 and 12.8 °C. All of these environmental parameters showed significant differences between the two seasons. Due to these different conditions, DOC concentrations were also significantly higher in April 2016 than in September 2015 with their average at  $1.9 \pm 0.27$  and  $2.58 \pm 0.34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively. These results illustrate that the Seine estuary presented two significant periods in terms of salinity, DOC, river discharge and water temperature. Summer period (September 2015) was characterized by high variations of salinity, low river discharges and DOC, and high temperatures, whereas winter period was characterized by lower salinity variations, high river discharges and DOC, and lower water temperature. Using these differences, it seemed that summer period was more conducive to primary production and ocean – river mixing while conversely the winter period showed terrestrial inputs. To provide information on the composition, sources and size of DOM, spectroscopic measurements were performed.

## 2 Variations in CDOM characteristics

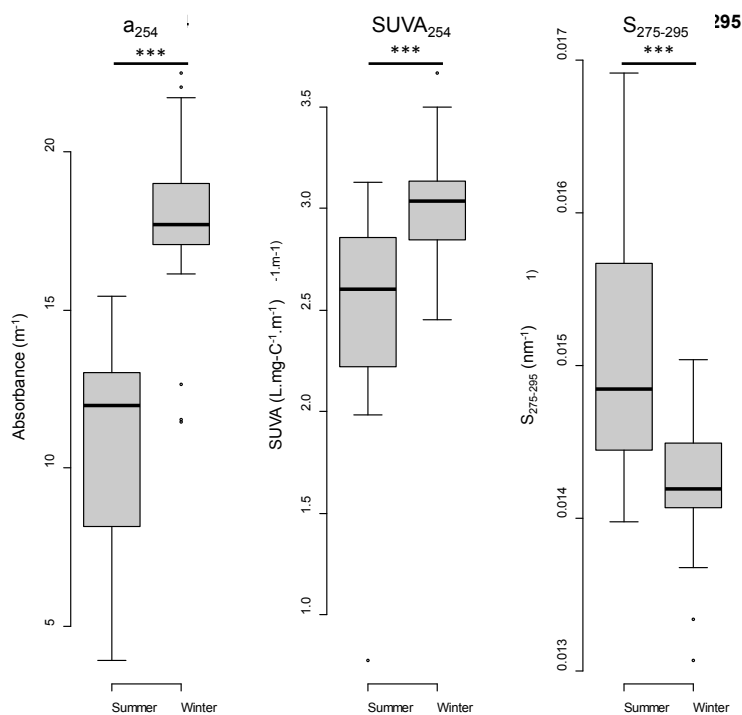


Figure VI-10: Box plots comparing  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and  $S_{275-295}$  between summer 2015 and winter 2016

As observed for DOC concentration, CDOM absorbance ( $a_{254}$ ) (Figure VI-10) was lower in summer than in winter and significantly different ( $p < 0.001$ ) with averages at  $11.1 \pm 3.2$  and  $17.8 \pm 2.5 m^{-1}$  respectively. Furthermore a Spearman correlation analysis showed a positive significant relation between  $a_{254}$  and DOC ( $p < 0.001$ ,  $r_s = 0.91$ ; Supplementary information VI-2), which seemed to indicate the direct influence of the terrestrial inputs on DOM composition and sources. The  $SUVA_{254}$  index results were in accordance with  $a_{254}$  results with values in summer and winter at  $2.52 \pm 0.5$  and  $3.0 \pm 0.3 L \cdot mg^{-1} \cdot C^{-1} \cdot m^{-1}$ , respectively. Unlike  $a_{254}$ , a weaker relation was observed between  $SUVA_{254}$  and DOC ( $p < 0.001$ ,  $r_s = 0.53$ ). The slope  $S_{275-295}$  index, informing on molecular weight and inputs of terrigenous DOM, presented summer values significantly higher than the winter ones with averages, respectively, at  $0.0152 \pm 0.0009$  and  $0.0142 \pm 0.0004 nm^{-1}$  (Figure VI-10). These results indicated a significant difference between these two sampling periods with specific DOM linked to the environmental parameters and processes.

### 3 Molecular weight distribution along the estuary gradient

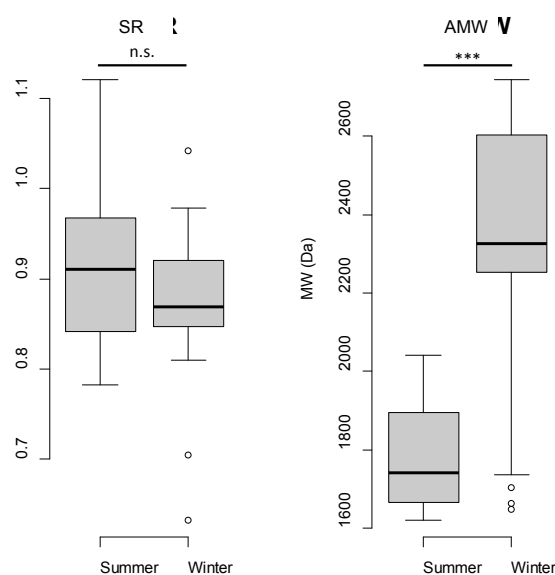


Figure VI-11: Box plots comparing *Sr* index and DOM molecular weight determined by AF4 between summer 2015 and winter 2016

On the one hand, absorbance analysis of DOM allowed us to approximate the molecular weight distribution using the SR index. On the other hand, the AF4 analysis, with appropriate calibration curves, was used to determine the apparent molecular weight of DOM along the Seine estuary for the four sites and the two seasons (Figure VI-11). SR values between September 2015 and April 2016 were not different with mean values, respectively, at  $0.91 \pm 0.09$  and  $0.88 \pm 0.08$ , while the molecular weight measured with AF4 showed significantly higher values in winter than in summer with respectively average at  $2320 \pm 307$  and  $1824 \pm 225$  Da. This suggested that the measure of SR could be here influenced by other factors, such as aromaticity for example, minimizing the effect of the only molecular weight. Moreover for both seasons, the DOM AMW, determined by AF4, decreased from the fluvial estuary (Caudebec) to the lower estuary (Honfleur), from 2572 Da to 2041 Da during the winter and from 1883 Da to 1675 Da during the summer. Even though the variations of SR appeared to be less informative for the studied samples, a similar trend was nevertheless observed considering this index, with an increase from upstream to downstream, thus also reflecting a decrease in AMW along the estuary towards the coastal area.



## 4 Variations in fluorescence properties

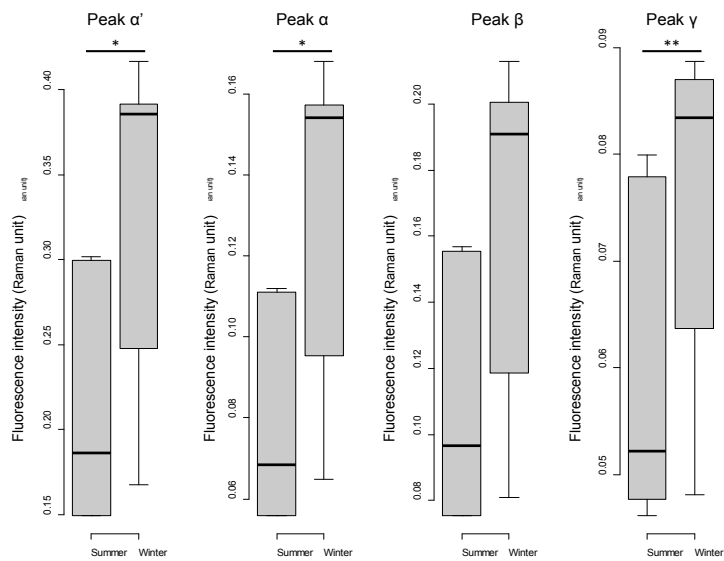


Figure VI-12: Box plots comparing between summer 2015 and winter 2016 the intensity of the four main fluorescence bands obtained by peak-picking

Using the peak-picking method on the EEM spectra, the four main fluorescence bands showed significantly higher values in winter than in summer. The peak  $\alpha'$  was the most present whatever the season, the site or the sampling depth. The repartition of the four peaks between the sites and the season did not present any significant differences with in mean respectively 24%, 18%, 24% and 11% of peak  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ .

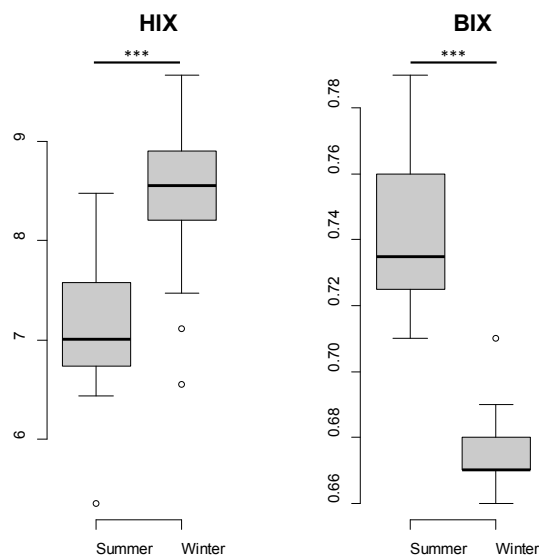


Figure VI-13: Box plots comparing HIX and BIX indices between summer 2015 and winter 2016

The Figure VI-13 highlighted significant differences for the fluorescence indices HIX and BIX between summer 2015 and winter 2016. Summer DOM presented significantly lower HIX and higher BIX unlike winter DOM. These differences suited to the shift in environmental conditions according to the seasons with higher temperatures and lower river discharges in summer and higher terrestrial inputs and a lower biological activity in winter. These results reflected however the relatively low variations of these indices in the Seine estuary whereas HIX has been determined between 5 and 14 and BIX from 0.5 to 1 in other estuarine ecosystems (Couturier et al., 2016; Huguet et al., 2009; Yang et al., 2015).

In summer, DOC showed lower concentrations with a decrease from terrestrial water inputs to ocean waters, and DOM had also lower absorbance (CDOM) and fluorescence intensities, in comparison to the winter 2016. Because of the environmental parameters in summer 2015, DOM was influenced by the water temperature and resulted from a mix of autochthonous and/or marine materials and allochthonous terrestrial matter characterized by the differences of HIX, BIX,  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and AMW indices between the two periods (Bittar et al., 2016; Jaffé et al., 2008; Vazquez et al., 2010). Fluorescence intensities of humic-like, protein like and biological and microbial peaks associated to the  $SUVA_{254}$  values and MW seemed to suggest that DOM in summer in the Seine estuary was influenced by the in-situ production and also DOM inputs from marine waters (Bittar et al., 2016; Ya et al., 2015). These differences in DOM sources and compositions can be due to the low river discharge directly responsible for the DOM terrestrial inputs.

DOC and river discharges in winter 2016 were higher in comparison with the summer 2015 (Figure VI-9) indicating higher inputs of terrestrial DOC and DOM during the winter. This increase in the river discharges resulted also in a change in DOM composition, sources, quality and quantity. This can be linked for a greater part of allochthonous DOM as shown by a DOC increase (Figure VI-9), a greater proportion in chromophoric, aromatic (significantly higher  $SUVA_{254}$ ,  $a_{254}$ ), an enrichment in humic-like DOM (significantly higher intensities of peaks  $\alpha'$  and  $\alpha$  and HIX; Figure VI-10) and an increase in DOM size (significantly higher AMW; Figure VI-11). These differences in DOM showed the influence of the river discharge which was the first contributor of terrestrial inputs into the Seine estuary (Bittar et al., 2016; Stedmon and Markager, 2005; Vodacek et al., 1997; Walker et al., 2009) and proved to be responsible in part of the DOM characteristics (Bittar et al., 2016; Medeiros et al., 2015). DOC concentrations were clearly in relation with river discharges and, finally in direct relation with the season. Unlike previous studies, DOC concentrations were higher during the winter (Benner and Opsahl, 2001; Guo et al., 2007; Stedmon et al., 2006) than during summer time with autochthonous production by microbial and bacterial activities.

In summer, lower river discharges associated with higher temperatures and light availability have been reported to led to significant changes in DOM composition and sources (Worrall et al., 2003). The

statistical approach implemented in this study proved the effects of water temperature, or at least its link, on the composition, sources, size of DOM according to seasons. A change in DOM type and composition during the summer, characterized by stronger water temperatures, is put forward by the significantly higher BIX index and lower AMW for summer samples. The water temperature, light absorption and low river discharge can be described as drivers for autochthonous DOM production and in the balance contributions between terrestrial and autochthonous DOM in the Seine estuary. BIX index, CDOM analysis and AMW allowed us to differentiate DOM in terms of composition and size. The protein-like fluorescence intensity (peak  $\gamma$ ) normalized by DOC (Supplementary information VI-1) highlighted the difference between summer and winter on the DOM composition (Huguet et al., 2009) and a positive correlation ( $p < 0.01$ ) was found between the water temperature and this index confirming the influence of this environmental factor on the DOM characteristics.

The study on DOM between these two seasons permitted to extrapolate a DOC and DOM diminution concentration between winter and summer (Figure VI-9). Many processes can be taken into account but remained unclear and unexplained. During the summer with the diminution of precipitations, the river discharge was lower which can reduce the DOC source and also the watershed drainage (Dixon et al., 2014). Furthermore, other processes as photo chemical, biological mineralization or the flocculation of DOM and DOC could be in part responsible of this removal (Helms et al., 2013a; Mopper et al., 2015; Sholkovitz, 1976; Ward et al., 2013).

## 5 PARAFAC modelling

PARAFAC processing of DOM fluorescence spectra produced, by their excitation and emission (ex/em) spectra, six independents and validated components. Component 1 (C1) had ex/em maximum at 260(340)/436 nm, component 2 (C2) had ex/em maximum at 270(380)/484 nm, component 3 (C3) had ex/em maximum at 250-310/385 nm, component 4 (C4) had ex/em maximum at 280/336 nm, component 5 (C5) had ex/em maximum at 270(340)/436 nm and component 6 (C6) had ex/em maximum at 250/452 nm (Figure VI-14). Four components could be characterized as humic-like (C1, C2, C5 and C6) since they displayed a broad emission around and above 400 nm. The component C3 seemed to be in relation with the fresh material produced in link with biological activity (Parlanti et al., 2000). The component C4 closely resembled to protein-like materials. The six PARAFAC fluorescent components modeled in this study (Figure VI-14 A-B) have been tested against the OpenFluor database (<http://www.openfluor.org/>) (Murphy et al., 2013). The statistical similarity between our components and fluorescence spectra was measured using Tucker's congruence coefficient. Criteria for matching components were set at 95% similarity and assessed through Tucker's Congruence Coefficient via the

OpenFluor database. The confrontation with this database showed 27 dataset matches and 28 component matches with similarity scores greater than 0.95 for C1, C2, C3 and C5 while C4 and C6 did not have any match. Matches of each component from our model with components from the OpenFluor database are provided in Supplementary information VI-3.

In the literature, the positions of wavelength maximum for C1, C2 and C6 have been attributed to peaks  $\alpha'$  and  $\alpha$ , (Coble, 1996; Parlanti et al., 2000). C1 has been previously proposed as ubiquitous DOM enriched by terrestrial/allochthonous sources and partly corresponding to refractory material (Guéguen et al., 2015; Maie et al., 2012; Stedmon and Markager, 2005) and C2.

The humic-like components C1 and C2 are well known from diverse studies and the component C1 was often found as the most dominant fluorescent component. This component presented the peculiarity to be found at all depths in the global ocean, in estuaries, wetlands, sea ice and brine (Guéguen et al., 2014; Jørgensen et al., 2011; Stedmon et al., 2007; Yamashita et al., 2011), whereas C2 was principally found in open ocean seawater, estuaries and drinking water (Kowalczyk et al., 2013; Murphy et al., 2008; Shutova et al., 2014; Yamashita et al., 2013).

Humic-like components C1 and C2 are the most common fluorophores of DOM found in freshwater and estuarine environments and as the statistic tests of correlation are generally associated with higher MW and aromatic molecules of terrestrial sources, they were generally linked to the river discharge and influenced by the season (Lambert et al., 2016; Stedmon and Markager, 2005; Walker et al., 2013; Yamashita et al., 2008).

On the contrary, the C3 and C4 components can be attributed to protein-like and biological activity and have been shown to be more biodegradable and fresher microbially or bacterially produced DOM (Catalá et al., 2016; Fellman et al., 2008; Yamashita and Tanoue, 2003). C5 could be assigned to industrial effluents as previously reported (Cawley et al., 2012; Santos and Duarte, 1998). All of these components have been already observed in previous studies for various aquatic environments (Catalá et al., 2015; Guéguen et al., 2015; Maie et al., 2012; Stedmon and Markager, 2005; Yamashita et al., 2008).

The component C3, that we observed, was similar to more recent material components (microbial or bacterial production) found in other PARAFAC models performed in estuaries and rivers (Lambert et al., 2016; Yamashita et al., 2010; Huarong Yu et al., 2015), as well as others from recycled water, wastewater and coagulated water (Murphy et al., 2011; Shutova et al., 2014). The association of C3 with DOC, optical indices including  $a_{254}$ , HIX and the negative correlation with SR and BIX promoted for a terrestrial more aromatic or degraded compounds. Moreover C3 can be related to the microbial activity because of the non-difference between summer and winter whereas the river discharge were

different, influenced by the production of DOM within the aquatic ecosystem (Kellerman et al., 2015; Kothawala et al., 2015). This component has been reported to originate from the autochthonous primary production (Lapierre and Frenette, 2009; Yamashita et al., 2008) or from the terrestrial DOM degradation within the aquatic system as previously described in diverse environments (Kellerman et al., 2015; Lambert et al., 2016; Stedmon and Markager, 2005; Walker et al., 2013). The opposite compartment of C1-C2 vs. C3 could show that C3 could result from the transformation of terrestrial components C1-C2 by microbial and bacterial activities as previously reported (Jørgensen et al., 2011; Lambert et al., 2016).

As for the component C5, it has been previously observed in coastal and shelf areas and has been described as industrial effluents. In two different sites, in Sweden and US, this component was associated with pulp mill effluents with a potential signature of lignosulfonic acid and lignin sulfonates (Cawley et al., 2012; Nyquist, 1979; Santos et al., 2001). The presence of this component in the Seine estuary could indicate the potential inputs of effluents from the wood-processing or pulp mill industry. This specific component showed no clear relation with other components but it was positively correlated to the water temperature using Spearman rank correlation (Supplementary information VI-2) and the MLR model fixed the water temperature as the primary predictor.

No correspondence with the components C4 and C6 was found by using the OpenFluor database but the C4 component represented a group of fluorescent substances associated with protein-like substances and seemed to be explained in previous studies by various origins, anthropogenic sources or microbial degradation (Lambert et al., 2016; Massicotte and Frenette, 2011; Stedmon and Markager, 2005; Walker et al., 2013; Yamashita et al., 2008). The variations of this component did not show any difference between the two seasons despite the different river discharges which seemed to indicate two separate sources, allochthonous and autochthonous.

The component C6, determined in this study, appeared to be a contributor to the classical humic-like peak  $\alpha'$ . This component has also been detected previously in terrestrial and coastal environments with potential terrestrial origins and photochemical degradation (Cawley et al., 2012; Kellerman et al., 2015; Stedmon and Markager, 2005; Yamashita et al., 2010). This component was not related to terrestrial descriptors and did not present seasonal difference in this work.

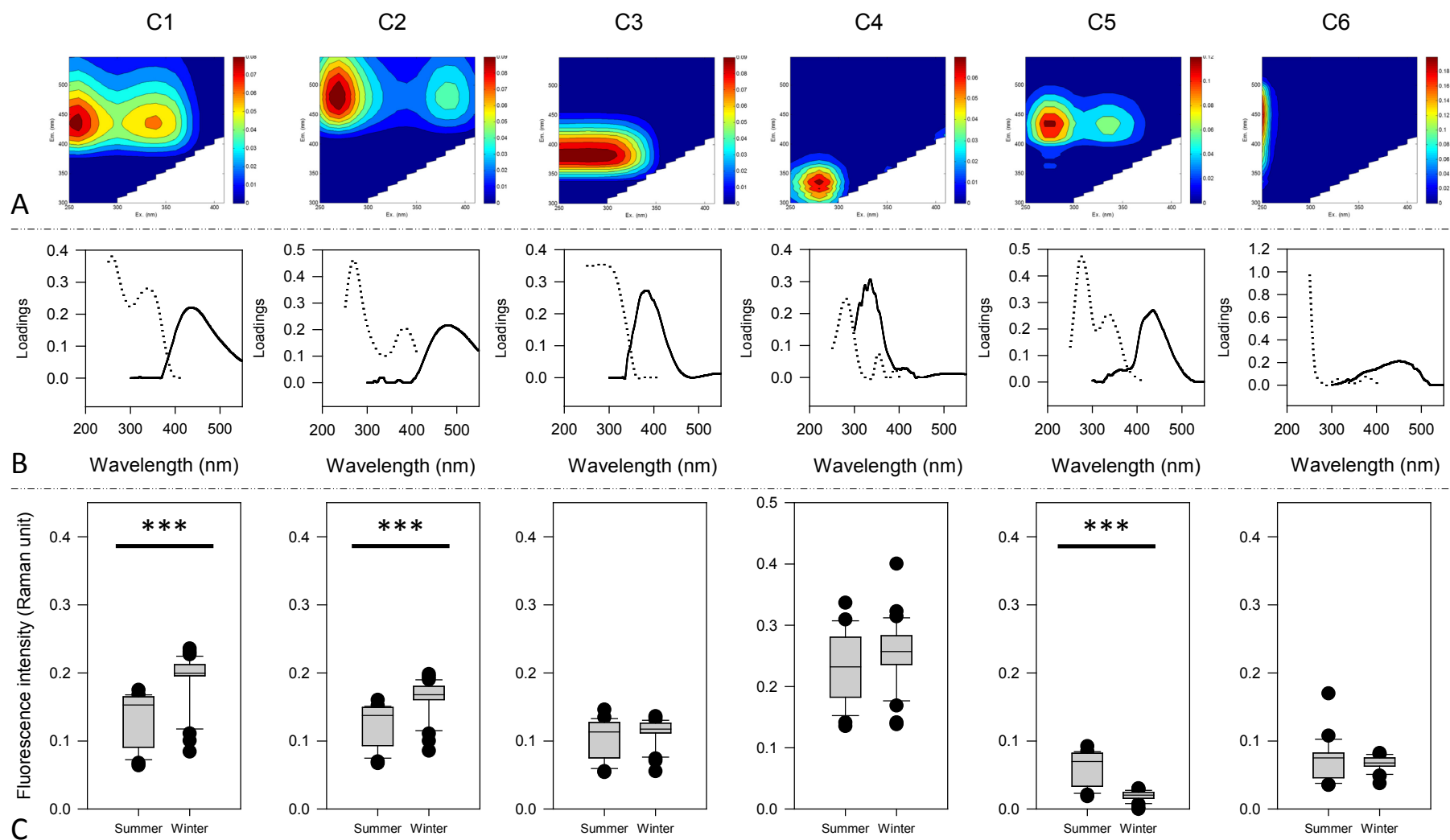


Figure VI-14: (A) Contour plots of six components validated by PARAFAC (warmer colors represented greater fluorescence intensities), (B) spectral loadings of the six components (dot line: excitation spectra; line: emission spectra) and (C) box plots comparing the six components between summer 2015 and winter 2016

## 6 Multiple linear regression (MLR) models

The MLR approach on the whole dataset allowed to identify water temperature and salinity as the primary predictors of DOM descriptors and parameters (Table VI-4). The better predicted factors using this models were DOC concentration, fluorescence peaks  $\alpha'$  and  $\alpha$ , PARAFAC component C1, C2, C3, C4 and C6, BIX,  $a_{254}$  and the DOM AMW. Globally, DOM descriptors were predicted by salinity, whereas for humification and aromatic characteristics (HIX,  $a_{254}$  and SUVA<sub>254</sub> parameters) and for a very specific component, C5, the water temperature was a better predictor. And for the BIX the both, water temperature and salinity, were very good predictors ( $p=0.917$ ) with equal p-values.

Then, MLR models were conducted separately on summer and winter datasets. For both seasons, the salinity was considered as the primary predictor for most parameters DOC, fluorescence peaks  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ , PARAFAC modelled components C1, C2 and C3, spectral slope ratio SR and DOM MW. In summer the first and unique primary predictor was the salinity. In winter, the protein-like fluorescence peak  $\gamma$ , the PARAFAC components C4, C5 and C6, the biological index BIX and the SUVA<sub>254</sub> were first predicted by the water temperature. The MLR approach on the winter period highlighted the water temperature as the first predictor. Thus the higher water temperature coupled to freshwater inputs could explained the presence of the C4 component. These observations reflected the shift in environmental conditions between both seasons, with a more homogenous water temperature along the ocean-river continuum in summer while in winter the continental waters have higher temperatures than marine waters.

A temperate estuary is influenced by many morphological and environmental parameters such as estuary profile, hydrological forces, climate, biological and chemical activities. Physical and hydrological forces are controlled by many variables, river discharges, precipitations, groundwater inputs, tidal forces which finally affected the river-ocean mixing and the DOM dynamics. The importance of these different variables remained little understood and under documented. It is then difficult to measure their individual influence on the variation of DOM descriptors. The aim of the MLR approach in this study was not to explain the mechanisms influencing the DOM dynamics but this approach was used as a descriptor of the seasonality effect along this estuary. In this model, water temperature and salinity variables were used as environmental predictors, whereas, most of the time, their effects on DOM characteristics, dynamics and composition were not direct.

The water temperature has a great influence on the primary production, bacterial and microbial activities which may directly affect them the DOM composition and concentration. These processes and activities involved between DOM and environmental variables has not been measured nor quantified.

The MLR approach informed about the relative effect of the environmental descriptors (water temperature and salinity) on the DOM composition, size and characteristics. Three trends could be extrapolated from this model to the complete dataset (summer + winter), showing a clear relationship between DOC concentrations, DOM optical properties and DOM components (C1, C2, C3, C4 and C6) with the salinity. It also highlighted the relationship between the DOM size and molecular weight with the salinity and finally a link between the aromatic characteristics (HIX and SUVA) and the component C5 with the water temperature. In the Seine estuary, DOM has many potential sources (autochthonous, allochthonous production) and all the organisms and molecules, in this transition area, may be influenced by the changes in salinity and also the waters mixing. The biological activity is directly influenced by the water temperature and the inputs from the fluvial waters charged in particulate and dissolved organic matter.

The MLR models applied, on the one hand, to the complete dataset and, on the other hand, to the summer and winter datasets separately, allowed us to get pertinent information about DOM response to the changes in environmental conditions. This approach confirmed the seasonal trends for DOM composition according to specific activities in this estuary. Salinity, river discharges, fluvial inputs and water temperature were significantly different between the two seasons and finally the DOM composition, size and type were significantly influenced. In summer, the water temperature seemed to drive the aromaticity of DOM but also the protein-like contribution to the pool. The water temperature in this temperate estuary, and for this dataset, could thus be an indicator of terrestrial inputs. Indeed in winter, these inputs were a source into the mixing area of warmer waters and materials which contributed to stimulate the autochthonous production.



Table VI-4: Multiple linear regression (MLR) approaches with salinity and water temperature defined as potential predictors of variability. Adjusted R<sup>2</sup> = proportion of variability explained by MLR; p values = significance of prediction; n.s. = not significant MLR.

<b>Summer + Winter</b>					
<b>Parameters</b>	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	<b>Primary predictor</b>	<b>p-value</b>	<b>Secondary predictor</b>	<b>p-value</b>
DOC	0.78	Salinity	6.84E-13	Water temperature	3.44E-12
α'	0.85	Salinity	2.00E-16	Water temperature	5.85E-05
α	0.87	Salinity	2.00E-16	Water temperature	6.65E-08
β	0.80	Salinity	2.00E-16	n.s.	
γ	0.54	Salinity	1.36E-10	n.s.	
HIX	0.54	Water temperature	2.59E-09	Salinity	2.84E-03
BIX	0.92	Salinity	2.00E-16	Water temperature	2.00E-16
a <sub>254</sub>	0.77	Water temperature	6.17E-13	Salinity	5.78E-12
SUVA <sub>254</sub>	0.36	Water temperature	1.63E-04	Salinity	7.26E-04
S <sub>275-295</sub>	0.60	Salinity	6.52E-09	Water temperature	5.13E-06
SR	0.40	Salinity	1.15E-07	n.s.	
AMW	0.72	Salinity	2.59E-12	Water temperature	6.65E-09
C1	0.91	Salinity	2.00E-16	Water temperature	6.99E-15
C2	0.82	Salinity	2.00E-16	Water temperature	3.53E-09
C3	0.81	Salinity	2.00E-16	n.s.	
C4	0.66	Salinity	2.66E-14	n.s.	
C5	0.70	Water temperature	1.97E-15	Salinity	7.21E-05
C6	0.3941	Salinity	2.43E-07	n.s.	2.23E-02
<b>Summer 2015</b>					
DOC	0.80	Salinity	9.14E-07	n.s.	
α'	0.86	Salinity	5.27E-09	n.s.	
α	0.89	Salinity	4.99E-10	n.s.	
β	0.86	Salinity	5.49E-09	n.s.	
γ	0.43	Salinity	1.25E-03	n.s.	
HIX	0.07	n.s.		n.s.	
BIX	0.69	Salinity	2.02E-06	n.s.	
a <sub>254</sub>	0.43	Salinity	1.02E-03	n.s.	
SUVA <sub>254</sub>	0.13	Salinity	3.38E-02	n.s.	
S <sub>275-295</sub>	0.74	Salinity	3.06E-07	n.s.	
SR	0.64	Salinity	5.01E-06	n.s.	
AMW	0.73	Salinity	2.29E-05	n.s.	
C1	0.89	Salinity	1.24E-10	n.s.	
C2	0.84	Salinity	7.97E-09	n.s.	
C3	0.88	Salinity	9.27E-10	n.s.	
C4	0.73	Salinity	1.16E-06	n.s.	
C5	0.87	Salinity	1.80E-09	n.s.	
C6	0.525	Salinity	7.20E-03	n.s.	
<b>Winter 2016</b>					
DOC	0.43	Salinity	2.54E-03	n.s.	
α'	0.74	Salinity	2.39E-05	n.s.	
α	0.72	Salinity	5.58E-05	n.s.	
β	0.73	Salinity	1.14E-05	Water temperature	2.73E-02
γ	0.68	Water temperature	1.28E-03	n.s.	
HIX	0.22	Water temperature	2.53E-03	Salinity	3.49E-03
BIX	0.46	n.s.		n.s.	
a <sub>254</sub>	0.44	n.s.		n.s.	
SUVA <sub>254</sub>	0.24	Water temperature	2.99E-03	Salinity	1.40E-02
S <sub>275-295</sub>	0.00	n.s.		n.s.	
SR	0.23	Salinity	9.76E-03	n.s.	
AMW	0.61	Salinity	4.58E-02	n.s.	
C1	0.7844	Salinity	8.59E-06	n.s.	
C2	0.5369	Salinity	1.02E-03	n.s.	
C3	0.7093	Salinity	3.59E-05	n.s.	
C4	0.6144	Water temperature	9.65E-03	n.s.	
C5	0.1749	n.s.		n.s.	
C6	0.455	Water temperature	6.25E-03	n.s.	

All the modelled components, except C5 and C6, presented a relative higher abundance in the fluvial and upper estuaries (Caudebec and Tancarville) while for C5 and C6 no clear difference was observed along the Seine estuary. C1, C2 and C5 showed significant differences according to the seasons. C1 and C2 were significantly higher in winter whereas C5 was higher in summer for all the dataset but also for each site (Caudebec, Tancarville, Fatouville and Honfleur).

Moreover, using a Spearman's rank correlation, these C1 and C2 components presented significant positive correlations with DOC concentration, turbidity, HIX, SUVA<sub>254</sub>, a<sub>254</sub> and MW while negative correlations with the temperature, salinity, BIX, S<sub>275-295</sub> and SR (Supplementary information VI-2). Whatever the sampling period of this study, summer or winter, the principal predictor for C1 and C2 was the salinity which was in adequacy with their decrease along the salinity gradient ( $r^2=0.72$  and  $0.66$  respectively for C1 and C2). These only two components were related to DOC concentration ( $r^2=0.82 - 0.78$  respectively for C1 and C2,  $<0.01$ ). A good correlation between the distributional patterns of the components C1 and C2 were observed ( $R = 0.96$ ,  $P < 0.001$ ). These two components highlighted thus the fluvial inputs along the Seine estuary and the seasonal differences seemed to be linked with the river discharges. The modelled components C1 and C2 thus seemed to be related to degraded materials.

The component C3 showed similar fluorescence characteristics to other PARAFAC components related to microbial produced materials previously reported (Cory and McKnight, 2005; Lambert et al., 2016; Yamashita et al., 2010, 2008). It was distributed relatively uniformly throughout the estuary. Although the variability of component C3 was clear along the estuary with a decrease when salinity increase ( $r^2=0.82$ ) and positive correlation with DOC using the Spearman's rank correlation ( $r_s=0.61$ ,  $p<0.001$ ; Supplementary information VI-2), no difference was found between winter and summer periods. The C3 component presented a good correlation with the C1 and C2 components ( $r^2=0.7-0.71$ ,  $p<0.001$ ; Supplementary information VI-2). C3 and AMW were highly also positively correlated ( $r_s=0.63$ ,  $p<0.001$ ; Supplementary information VI-2).

The PARAFAC component C4 was similar to protein-like components and peak  $\gamma$  previously observed (Stedmon and Markager, 2005; Yamashita et al., 2010, 2008). Its spatial distribution showed a decreased along the estuary associated to a positive correlation with the DOC concentration ( $r_s=0.5$ ,  $p<0.001$ ) and a negative correlation with the salinity ( $r_s=-0.76$ ,  $p<0.001$ ). The distribution of this component was correlated to the components C1 and C3 (with respective  $r_s= 0.56$ ;  $0.78$ ,  $p<0.001$ ).

The modelled component C5 could be assigned to a very specific origin of industrial effluents, from pulp mill, as previously reported (Cawley et al., 2012; Nyquist, 1979; Santos et al., 2001). Along the salinity gradient in the lower estuary this component presented no difference whereas great variations

were observed in the fluvial and upper estuaries (Caudebec and Tancarville). Furthermore no relationship was found with the salinity nor with DOC concentration (respectively  $r^2=0.05 - 0.14$ ). This component C5 was only positively correlated with the water temperature which was the primary predictor.

The C6 component could be described as terrestrial humic-like compound. This component was not related in this study to terrestrial descriptors and did not present any seasonal difference.

## 7 Self-organizing maps (SOM)

The SOM highlighted the considerable variations of DOM characteristics between individual samples, sites and seasons, as summarized in the 6 x 10 Kohonen SOM (Figure VI-15). Samples showing similar DOM patterns were projected on neighboring cells of the hexagonal lattice. The clustering using a ward method showed 8 different clusters, evidenced by one color per cluster. The map was constructed with 23 variables (environmental data and DOM descriptors) and the color gradient for each compound differed from one compound to the other, as shown in the corresponding component planes (Figure VI-16). The SOM highlighted a clear difference between summer 2015 and winter 2016. Summer 2015 was representing by the four clusters in red, orange, apple green and midnight blue which were more influenced by the water temperature, salinity, PARAFAC components C5 and C6, SR, BIX and  $S_{275-295}$  using the corresponding component planes (Figure VI-16), whereas winter 2016 was characterized by higher values of DOC, PARAFAC components C1, C2, C3, C4 and C6, the four fluorescence bands, HIX,  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and the AMW.

The cluster in red was composed by summer samples (and two winter samples: Fatouville and Honfleur at high tide in surface and bottom respectively) at high tide from Honfleur, Fatouville and Tancarville with the highest values of BIX and the lowest values of Sr. The cluster in midnight blue was composed by Caudebec, Fatouville and Tancarville samples (in summer) mainly at low tide was characterized by high water temperature, intensities of PARAFAC components C3, C5 and C6, high values of BIX and low HIX and Sr. Between these clusters, two clusters composed by only four summer samples were present (Tancarville at high tide in bottom, Caudebec at ebb tide in surface and Honfleur at low tide in surface and bottom).

In the winter part of the SOM (to the right of cluster map), the two neighboring clusters with summer were only composed by three samples which could be characterized by intermediate values of DOC, PARAFAC components C1, C2, C4, and C6, and HIX, high values of PARAFAC component C3, the four fluorescence bands ( $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ),  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and AMW. The turquoise blue cluster composed by samples from Tancarville, Honfleur and a part of the transect in the fluvial estuary, presented the

highest values of DOC, PARAFAC components C1, C2, C3 and C6, the four fluorescence bands ( $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), HIX,  $a_{254}$ , AMW and the lowest water temperature, and C5 intensity. Finally the last cluster in purple, composed by the downstream points of the transect and Fatouville samples was characterized by the lowest salinity and  $S_{275-295}$  and high values of DOC, PARAFAC components C1, C2, C3, C4 and C6, the four fluorescence bands,  $a_{254}$ ,  $SUVA_{254}$  and AMW.

The self-organizing maps (SOM) approach has already been used on fluorescence EEM spectra (Bieroza et al., 2011, 2009; Carstea et al., 2014; Cuss and Guéguen, 2015) but, to our knowledge, it was the first time that SOM were used with 23 variables from spectrophotometry UV/Vis, fluorescence analysis, MW from AF4 analysis and environmental data.

Relationships between environmental variables, fluorescence and spectrophotometry composition, PARAFAC analysis and molecular weight determination were clearly demonstrated by the SOM. The SOM results provided a good discrimination in DOM evolution and dynamics between the summer 2015 and the winter 2016. The evaluation of the SOM properties regarding sample distribution and the importance of variables provided significant information on the relationships between descriptors and potential processes. Furthermore, the SOM allowed us to link DOM descriptors, environmental variables with specific seasonal periods, sites and also tide periods which was not really possible with other statistical approaches. Comparing in the SOM results from the four fluorescence bands and PARAFAC modelled components validates the interest of the coupling between PARAFAC analysis and SOM for DOM studies. PARAFAC components showed much more differences and information than with the classical peak-picking fluorescence analysis.

In this study, the two seasons presented significant differences in terms of environmental variables like water temperatures, salinities and river discharges. The SOM highlighted these differences and showed their impacts on DOM characteristics by the representation of descriptors on the maps. The distance between nodes of the SOM maps indicated the similarity of the samples and thus could demonstrate the relative changes in organic matter quality and quantity between seasons, sites and also tide periods.

Peak  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  presented similar distributions on the SOM respectively with PARAFAC components C1, C2 and C3 which confirmed the correlation between these different DOM descriptors.

The fluorescence peak  $\gamma$  similar to the modelled component C4 has been previously related to aged DOM with different MW in marine, estuarine and wetland systems (Maie et al., 2007; Romera-castillo et al., 2014; Stolpe et al., 2014). This peak  $\gamma$  similar to C4 could also be the consequence of protein encapsulation by humic substances during DOM evolution from fluvial DOM to marine waters (Cuss and Guéguen, 2015; Romera-castillo et al., 2014; Sutton and Sposito, 2005).

The C5 PARAFAC modelled component was much more present in summer 2015, as previously showed, what could be related to the low river discharge during this period coupled to potential inputs from industrial pulp mill effluents. In winter the river discharges were higher which could result in a dilution of this specific anthropogenic input.

The repartition in the component planes of the variables SR and AMW highlighted their differences, the approximation of the size factor, SR, and the AMW obtained with AF4 did not measure exactly the same property, and the absorbance of water is also influenced by other parameters such as aromaticity.

The SOM results provided a good discrimination between the tide periods with the high tide in the lower left corner which can be linked to typical marine waters characterized by low size, aromaticity and fluorescence intensities.

Thus, given the size of our dataset, the Kohonen mapping (SOM) proved to be a powerful tool to highlight differences of DOM characteristics between sampling locations, seasons and tide periods.

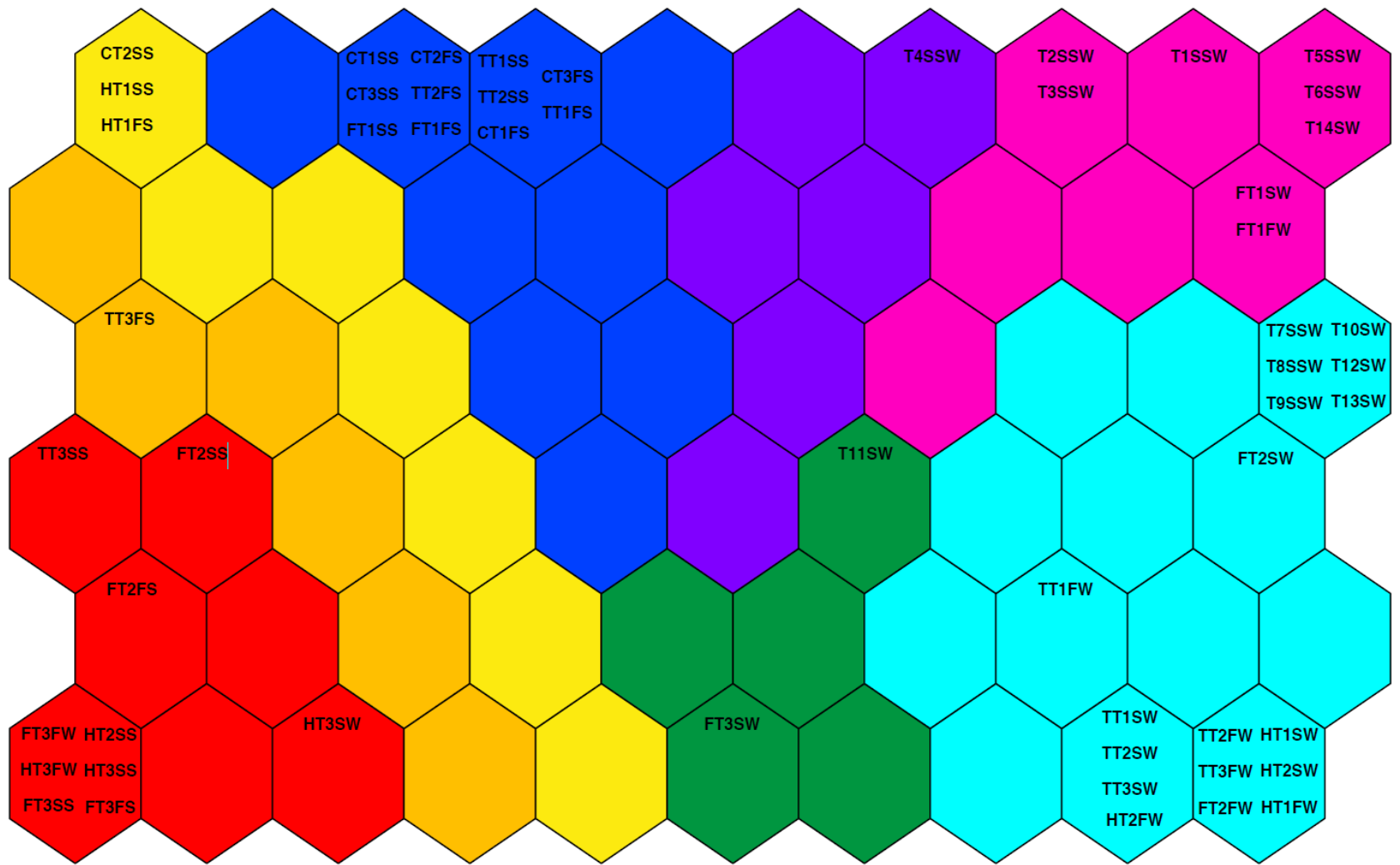


Figure VI-15: Kohonen self-organizing map combined with ward clustering

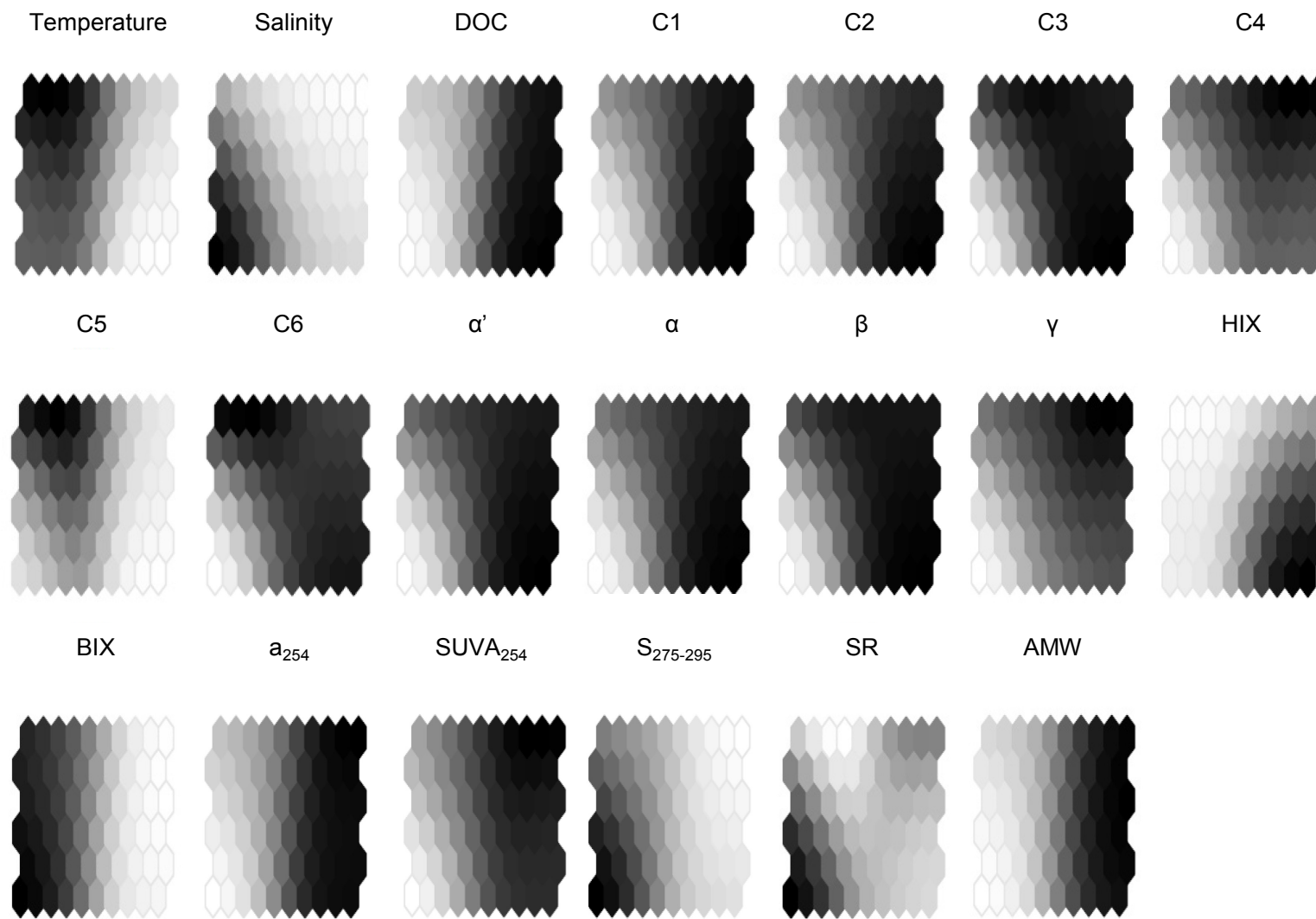


Figure VI-16: Component planes corresponding to the Kohonen self-organizing map

## VIII Conclusions

This work combining AF4, optical spectroscopy (UV/Vis and fluorescence) and statistical processing allowed us to discriminate DOM properties between seasons (summer and winter), tides and sample locations in the estuary. The PARAFAC analysis determined six components explaining the whole fluorescence dataset and highlighted differences in DOM sources according to the seasons. Moreover, one peculiar component (C5), which could be an indicator of pulp mill inputs, was determined only in summer when the river discharge was lower.

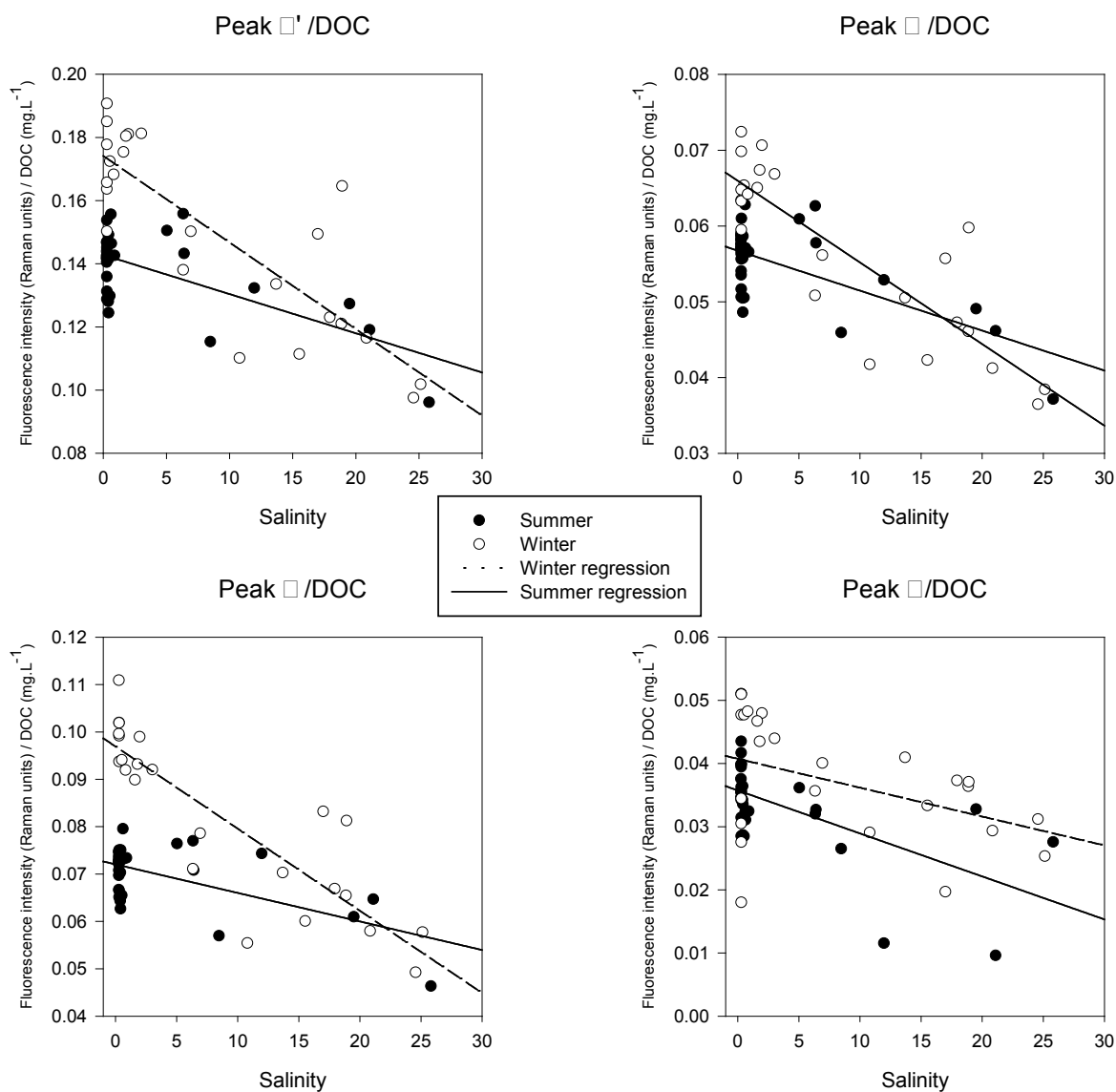
The Model Linear Regression (MLR) applied to the whole dataset showed all the interest to considered both environmental variables and DOM descriptors. MLR has notably permitted to point out the influence of water temperature on the DOM variability in winter period.

This work showed that SOM was a very interesting tool to highlight spatiotemporal variations of DOM. Not only, it showed clear differences in DOM characteristics according to seasons, tides and sampling sites, but furthermore, SOM allowed us to link specific DOM descriptors to peculiar temporal or spatial parameters. In particular, the PARAFAC component C5 was specifically related to low tide during the summer. These environmental conditions thus seemed to reveal the potential pulp mill inputs in the Seine estuary.

Finally, the combined analytical and statistical approach developed in this work was shown to be very powerful to study DOM dynamics in complex environments.



## Supplementary information



Supplementary information VI-1 : Fluorescence peaks normalized to DOC concentration along the salinity gradient in the Seine estuary (black dots: summer samples; white dots: winter samples)

	Salinity	DOC	Turbidity	Oxygene	C1	C2	C3	C4	C5	C6	A'	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	HIX	BIX	a <sub>254</sub>	SUVA	S <sub>275295</sub>	Sr	MW	
Temperature	0.00738 0.957	-0.543 ***	-0.58 ***	0.272 *	-0.529 ***	-0.545 ***	-0.0125 0.926	0.116 0.394	0.851 ***	0.255 0.0577	-0.372 **	-0.476 ***	-0.0772 0.57	-0.062 0.649	-0.7 ***	0.614 ***	-0.556 ***	-0.336 *	0.405 **	0.0511 0.708	-0.384 **	
Salinity		-0.549 ***	-0.384 **	-0.144 0.289	-0.595 ***	-0.506 ***	-0.452 ***	-0.756 0.96	-0.00684 **	-0.264 *	-0.528 ***	-0.553 ***	-0.51 ***	-0.633 ***	-0.2 0.139	0.604 ***	-0.507 ***	-0.49 ***	0.482 ***	0.456 ***	-0.85 ***	
DOC			0.761 ***	-0.202 0.135	0.931 ***	0.929 ***	0.614 ***	0.504 ***	-0.414 **	0.386 **	0.851 ***	0.906 ***	0.66 ***	0.569 ***	0.681 ***	-0.804 ***	0.908 ***	0.526 ***	-0.57 ***	-0.482 ***	0.745 ***	
Turbidity				-0.432 ***	0.782 ***	0.775 ***	0.347 **	0.323 *	-0.531 ***	0.176 0.193	0.606 ***	0.726 ***	0.331 *	0.484 ***	0.653 ***	-0.747 ***	0.837 ***	0.635 ***	-0.568 ***	-0.258 0.0552	0.68 ***	
Oxygene					-0.0991 0.466	-0.129 0.343	0.139 0.306	0.145 0.285	0.351 **	0.188 0.164	0.0218 0.873	-0.0654 0.631	0.191 0.159	0.022 0.871	-0.197 0.145	0.146 0.283	-0.253 0.0596	-0.143 0.291	0.137 0.312	-0.254 0.0593	0.00137 0.992	
C1						0.962 ***	0.7 ***	0.563 ***	-0.417 **	0.412 **	0.899 ***	0.972 ***	0.725 ***	0.645 ***	0.695 ***	-0.786 ***	0.895 ***	0.611 ***	-0.55 ***	-0.578 ***	0.801 ***	
C2							0.708 ***	0.468 ***	-0.368 **	0.477 ***	0.914 ***	0.968 ***	0.713 ***	0.583 ***	0.768 ***	-0.793 ***	0.919 ***	0.618 ***	-0.574 ***	-0.557 ***	0.741 ***	
C3								0.677 ***	0.164 **	0.765 ***	0.83 ***	0.774 ***	0.958 ***	0.54 ***	0.355 **	-0.346 **	0.569 ***	0.394 **	-0.294 *	-0.759 ***	0.456 ***	
C4									0.12 0.377	0.442 ***	0.548 ***	0.538 ***	0.675 ***	0.785 ***	-0.0552 0.685	-0.366 **	0.468 ***	0.415 **	-0.354 **	-0.487 ***	0.631 ***	
C5										0.406 **	-0.222 0.0999	-0.33 *	0.103 0.45	-0.0521 0.702	-0.46 ***	0.451 ***	-0.422 **	-0.252 0.0611	0.295 *	-0.0941 0.489	-0.355 **	
C6											0.617 ***	0.492 ***	0.709 ***	0.41 **	0.241 0.0732	-0.165 0.223	0.339 *	0.245 0.0687	-0.205 0.128	-0.602 ***	0.197 0.145	
$\alpha'$												0.941 ***	0.822 ***	0.615 ***	0.649 ***	-0.666 ***	0.8 ***	0.489 ***	-0.433 ***	-0.703 ***	0.687 ***	
$\alpha$													0.785 ***	0.63 ***	0.718 ***	-0.748 ***	0.877 ***	0.59 ***	-0.533 ***	-0.628 ***	0.768 ***	
$\beta$														0.466 ***	0.375 **	-0.405 **	0.563 ***	0.376 **	-0.303 *	-0.743 ***	0.495 ***	
$\gamma$															0.207 0.126	-0.508 ***	0.601 ***	0.481 ***	-0.431 ***	-0.432 ***	0.668 ***	
HIX																				-0.703 ***	0.687 ***	0.515 ***
BIX																						-0.794 ***
a <sub>254</sub>																						-0.794 ***
SUVA																						-0.794 ***
S <sub>275295</sub>																						-0.794 ***
SR																						-0.419 **

Supplementary information VI-2: Spearman correlation rank test results

Component	Number of matches	Sources	References
<b>C1</b>	<b>10</b>	<p>Lakes</p> <p>Stream, river, estuary, ocean - coastal and shelf seas</p> <p>Streams</p> <p>Estuary, ocean - coastal and shelf seas</p> <p>Seawater, Sea ice</p> <p>Ocean - coastal and shelf seas, ocean - surface off-shore, ocean - deep off-shore</p> <p>Seawater</p> <p>Stream, river</p> <p>Stream</p> <p>Seawater samples</p>	<p>Osburn, C.L., Wigdahl, C.R., Fritz, S.C. and Saros, J.E., 2011, Dissolved organic matter composition and photoreactivity in prairie lakes of the U.S. Great Plains</p> <p>Murphy, K.R., Bro, R., Stedmon, C.A., 2014, Chemometric analysis of organic matter fluorescence. in: Coble, P., Baker, A., Lead, J., Reynolds, D., Spencer, R. (Eds.). Aquatic organic matter fluorescence. Cambridge University Press, New York.</p> <p>Yamashita, Y., Kloeppel, B.D., Knoepp, J., Zausen, G.L., Jaffe, R. 2011. Effects of Watershed History on Dissolved Organic Matter Characteristics in Headwater Streams. <i>Ecosystems</i> 14, 1110_1122.</p> <p>Murphy, K.R., Stedmon, C.A., Graeber, D., Bro, R., 2013, Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. <i>PARAFAC. Anal. Methods</i>, 5, 6557-6566</p> <p>Stedmon, C.A., Thomas, D.N., Granskog, M., Kaartokallio, H., Papadimitriou, S., Kuosa, H., 2007. Characteristics of dissolved organic matter in baltic coastal sea ice: Allochthonous or autochthonous origins? <i>Environ Sci Technol</i> 41, 7273-7279.</p> <p>Jørgensen L, CA Stedmon, T Kragh, S Markager, M Middelboe, M Søndergaard, M. Global trends in the fluorescence characteristics and distribution of marine dissolved organic matter. <i>Mar. Chem.</i> 126 (139-148) 2011</p> <p>Walker SA, Amon RMW, Stedmon C, Duan S, Louchouart P, 2009, The use of PARAFAC modeling to trace terrestrial DOM and fingerprint water masses in coastal Canadian Arctic surface waters. <i>J. Geophys. Res. Biogeosci.</i> 114 (G4) G00F06</p> <p>Yamashita, Y., Maie, N., Briceno, H., Jaffe, R. 2010. Optical characterization of dissolved organic matter in tropical rivers of the Guayana Shield, Venezuela. <i>J Geophys Res</i> 115, G00F10.</p> <p>Nimptsch et al. (2015) 'Tracing dissolved organic matter (DOM) from land-based aquaculture systems in North Patagonian streams', <i>Science of the Total Environment</i> 537, 129-138.</p> <p>Gueguen et al., 'Absorption and fluorescence of dissolved organic matter in the waters of the Canadian Arctic Archipelago, Baffin Bay and the Labrador Sea', <i>JGR-Oceans</i>, 2014</p>
<b>C2</b>	<b>12</b>	<p>Ocean - surface off-shore, ocean - deep off-shore</p> <p>Ballast water, seawater, ocean - coastal and shelf seas, ocean - surface off-shore</p> <p>Marine environments</p> <p>Seawater, mesocosm</p>	<p>Kowalczyk, P., G. H. Tilstone, M. Zablocka, R. Röttgers, R. Thomas, 2013. Composition of Dissolved Organic Matter along an Atlantic Meridional Transect from fluorescence spectroscopy and Parallel Factor Analysis. <i>Marine Chemistry</i> 157, 170-184.</p> <p>Murphy, K.R., Ruiz, G.M., Dunsmuir, W.T.M., Waite, T.D., 2006. Optimized parameters for fluorescence-based verification of ballast water exchange by ships. <i>Environ Sci Technol</i> 40, 2357-2362.</p> <p>Murphy, K.R., Stedmon, C.A., Waite, T.D., Ruiz, G.M., 2008. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. <i>Mar Chem</i> 108, 40-58</p> <p>Stedmon, C. A.; Markager, S.; Tranvik, L.; Kronberg, L.; Slatis, T.; Martinsen, W., 2007, Photochemical production of ammonium and transformation of dissolved organic matter in the Baltic Sea. <i>Mar. Chem.</i> 104 (3-4), 227-240.</p>

		<p>River, stream, lake</p> <p>Seawater</p> <p>Ocean - coastal and shelf seas</p> <p>Stream, treated drinking water</p> <p>Reservoir water, treated drinking water</p> <p>Lakes, rivers, streams, wetlands, photodegradation essays</p> <p>Subtropical coastal lagoon</p> <p>Open ocean waters of the global ocean from 0 to 4000 m depth</p>	<p>Søndergaard M; Borch, N.H.; Stedmon CA. 2003. Fate of terrigenous dissolved organic matter (DOM) in estuaries: Aggregation and bioavailability. <i>Ophelia</i> 57(3) 161-176</p> <p>Walker SA, Amon RMW, Stedmon C, Duan S, Louchouart P, 2009, The use of PARAFAC modeling to trace terrestrial DOM and fingerprint water masses in coastal Canadian Arctic surface waters. <i>J. Geophys. Res. Biogeosci.</i> 114 (G4) G00F06</p> <p>Yamashita, Y., Boyer, J.N., Jaffe, R. 2013. Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy. <i>Continental Shelf Research</i> 66, 136-144.</p> <p>Shutova et al., 2014, Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths ', <i>Water Research</i>, v54, p159-169</p> <p>Shutova et al., 2014, 'Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths ', <i>Water Research</i>, v54, p159-169.</p> <p>Lapierre J.-F. and del Giorgio P. A., 2014. Partial coupling and differential regulation of biologically and photochemically labile dissolved organic carbon across boreal aquatic networks. <i>Biogeosciences</i>, 11, 5969–5985</p> <p>Amaral, V., Graeber, D., Calliari, D., &amp; Alonso, C. (2016). Strong linkages between DOM optical properties and main clades of aquatic bacteria. <i>Limnology and Oceanography</i>.</p> <p>Catalá, T. S. et al., 2015. Turnover time of fluorescent dissolved organic matter in the dark global ocean. <i>Nat. Commun.</i> 6: 5986.</p>
<b>C3</b>	<b>5</b>	<p>Recycled water, wastewater, treated water, greywater</p> <p>Wetland, estuary, mangrove</p> <p>Coagulated water</p> <p>River</p> <p>Rivers</p>	<p>Murphy, K.R., Hambly, A., Singh, S., Henderson, R.K., Baker, A., Stuetz, R., Khan, S.J., 2011. Organic matter fluorescence in municipal water recycling schemes: toward a unified PARAFAC model. <i>Environ Sci Technol</i> 45, 2909-2916</p> <p>Yamashita, Y., Scinto, L.J., Maie, N., Jaffe, R., 2010. Dissolved Organic Matter Characteristics Across a Subtropical Wetland Landscape: Application of Optical Properties in the Assessment of Environmental Dynamics. <i>Ecosystems</i> 13, 1006-1019.</p> <p>Shutova et al., 2014, 'Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths ', <i>Water Research</i>, v54, p159-169</p> <p>Yu, H., Liang, H., Qu, F., Han, Z. S., Shao, S., Chang, H., &amp; Li, G., 2015, Impact of dataset diversity on accuracy and sensitivity of parallel factor analysis model of dissolved organic matter fluorescence excitation-emission matrix. <i>Scientific reports</i>,</p> <p>Lambert T., Teodoru C. R., Nyoni F., Bouillon S., Darchambeau F., Massicotte, P., and Borges A.V., 2016, Along-stream transport and transformation of dissolved organic matter in a large tropical river, <i>Biogeosciences</i>, 13, 2727-2741.</p>
<b>C5</b>	<b>1</b>	River, estuary, ocean (coastal and shelf)	Cawley et al., 2012 'Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed', <i>Marine Pollution Bulletin</i> , v64, p1678-1687.

Supplementary information VI-3: Correspondence table Openfluor of the PARAFAC components obtain with this model and previous components



## Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ces travaux de thèse a été de développer et d'optimiser une méthode de fractionnement par couplage flux-force avec flux asymétrique pour la caractérisation de la matière organique naturelle en milieu aquatique. Les recherches ont été plus particulièrement conduites en deux grandes parties, l'une sur le développement d'une méthode de séparation de la MOD naturelle par AF4 et la comparaison de cette méthode optimisée avec celle utilisée dans le cadre d'une mobilité à l'Université de Trent (Canada), et l'autre sur l'application de cette méthode optimisée pour l'étude de la dynamique de la MOD dans les estuaires de Gironde et de Seine en parallèle de techniques, plus classiques, de caractérisation de la MOD.

Le développement de cette méthodologie et son application se sont articulés en trois parties :

L'optimisation du fractionnement par couplage flux-force avec flux asymétrique pour un appareil Eclipse 3 de Wyatt Technology a tout d'abord été effectuée. Pour cela il a été nécessaire au préalable d'identifier une stratégie analytique d'optimisation à partir des paramètres importants pour l'étude de la MOD par AF4. Le canal de séparation court a été choisi dans ces travaux, équipé d'une membrane de 1kDa (le plus bas seuil de coupure utilisable pour ce système) en polyéthersulfone et d'un espaceur de 490 $\mu$ m. Tout d'abord, le développement a été axé sur l'utilisation d'étalons de calibration pouvant avoir des comportements, au cours de la séparation, proches de ceux de la MOD. Pour cela, différentes macromolécules organiques ont été testées afin d'obtenir une courbe de calibration entre 1kDa et 66kDa. L'analyse de ces huit étalons de taille a permis de vérifier la linéarité, la résolution de la séparation et la reproductibilité. Les masses moléculaires apparentes de la MOD d'échantillons naturels ont de plus pu être calculées par l'utilisation de cette calibration. Dans la suite de l'optimisation, la force ionique et la composition de la phase mobile sont apparues comme étant des paramètres majeurs dans la séparation de la MOD, contrôlant, entre autres, le taux de recouvrement de l'échantillon, et donc la qualité ainsi que la résolution du fractionnement. Les résultats ont permis de voir que l'utilisation de forces ioniques supérieures à 10mM et de sels composés d'ions bivalents (MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>) ne permettaient pas d'obtenir une séparation qualitative de la MOD. En effet, dans ces conditions, les recouvrements diminuaient et les masses moléculaires calculées étaient surestimées. Par ailleurs, les résultats ont permis de définir l'utilisation d'une phase mobile composée de tampon phosphate à 5mM comme optimale pour l'étude de la MOD. La force du flux croisé et le temps de focus représentent deux des paramètres les plus influents sur le temps de rétention, la résolution, l'allure du fractogramme et la gamme de taille d'analyse. Finalement un flux croisé à 3mL/min et un

temps de focus de 7 minutes (5 minutes d'injection + focus et 2 minutes de focus) permettent un fractionnement optimal.

L'optimisation a été complétée par une étape de validation en deux parties. Tout d'abord, elle a porté sur la justesse et la reproductibilité de l'analyse de deux standards de MOD (SRFA et PF de l'IHSS). Une succession d'analyses de ces deux standards de MOD a permis de valider cette méthode de séparation AF4 tout en mettant en avant sa forte reproductibilité et son applicabilité à l'étude de la MOD (très faible écart-type des masses moléculaires et de taux de recouvrement mesurés). Dans un deuxième temps, la validation de cette méthode a été testée sur une série d'échantillons naturels avec des propriétés physico-chimiques différentes (salinité et pH) provenant de l'estuaire de la Gironde. La méthode a permis d'étudier les variations de la masse moléculaire de la MOD en parallèle d'une approche par spectrofluorimétrie pour étudier sa dynamique dans l'estuaire. Les conditions de fractionnement permettant la détermination de la masse moléculaire de la MOD et son étude dans des milieux environnementaux complexes comme les estuaires ont été ainsi validés. La robustesse, la fiabilité, et la reproductibilité des conditions analytiques développées à l'aide du système Eclipse 3 de Wyatt Technology ont été démontrées.

Ensuite, ce travail a porté sur la comparaison de deux méthodes de séparation par AF4-UV pour l'étude de la MOD à l'aide de deux systèmes AF4 différents. Dans le cadre d'une mobilité au Canada (Université de Trent), une méthode déjà développée avec un système AF2000 Focus de Postnova Analytics a été testée et a permis d'étudier le même lot d'échantillons naturels provenant de l'estuaire de la Gironde que pour la méthode optimisée précédemment. La méthode utilisée au Canada a été mise en œuvre avec une membrane en PES de 300Da, un espaceur de 500 $\mu$ m et une courbe de calibration à partir de cinq étalons (entre 550Da et 13.5kDa). La comparaison de ces deux méthodologies de séparation AF4 pour l'étude de la MOD a mis en évidence leurs différences, leurs avantages et leurs limites. Des conditions analytiques sensiblement différentes, plus particulièrement pour le seuil de coupure de la membrane, la composition de la phase mobile ainsi que les flux appliqués, ont entraîné l'obtention de résultats différents. La méthode utilisée avec le système de Postnova Analytics a permis d'utiliser une membrane avec un seuil de coupure plus petit que la méthode optimisée avec le système Wyatt Technology ce qui a permis l'étude de la MOD de plus petite taille.

Dans le cadre de l'étude d'échantillons de MOD naturelle ayant des propriétés physico-chimiques différentes, la méthode avec le système Postnova Analytics demandant l'utilisation de phases mobiles avec les mêmes conditions de salinité et pH que les échantillons, l'analyse de l'ensemble des échantillons a été particulièrement longue. En effet pour chaque condition physico-chimique d'échantillon, une nouvelle phase mobile a dû être préparée et le système étalonné. L'utilisation de la méthode optimisée avec le système Wyatt Technology a permis de travailler sur une gamme de taille

de MOD plus importante et de mieux estimer la masse moléculaire apparente de la MOD avec la courbe de calibration développée dans ces travaux à l'aide de huit étalons (macromolécules organiques). Il est important de noter qu'une des différences principales entre l'application de ces deux méthodes réside dans le gain de temps important avec la méthode optimisée avec le système Wyatt Technology. Ainsi cette partie a permis de confirmer l'intérêt de la méthode AF4 pour l'étude de la MOD naturelle.

Le second axe de cette thèse a été focalisé sur l'application de la méthode optimisée d'AF4 pour le système Wyatt Technology associée aux techniques de spectrométrie UV/vis et de fluorescence pour l'étude de la MOD naturelle. Le premier objectif a donc été d'appliquer cette méthode dans l'étude de la MOD de milieux aquatiques naturels complexes comme les estuaires et ce sur un grand nombre d'échantillons.

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à l'étude de la dynamique de la taille et des propriétés optiques de la MOD dans l'estuaire de la Gironde. La méthode AF4 optimisée dans le cadre de ces travaux de thèse a donc permis d'étudier la dynamique de la taille de la MOD dans l'estuaire de la Gironde. La masse moléculaire moyenne ainsi que les propriétés optiques de la MOD changent fortement le long du continuum rivière-océan de ce système estuarien. Le mélange des eaux douces et marines constitue un des principaux facteurs influençant la MOD le long de l'estuaire mais il ne peut cependant pas être considéré comme le seul. Le bouchon vaseux dans l'estuaire de la Gironde peut avoir un rôle important dans l'évolution de la MOD que ce soit d'un point de vue chimique ou biologique.

L'analyse statistique (ACP) des différentes variables (taille, COD, propriétés optiques) de caractérisation de la MOD a permis de mettre en avant la discrimination de quatre zones spécifiques dans l'estuaire de la Gironde (entre les salinités de 2-7, 7-12, 12-27 and > 27) ce qui confirme et complète les études précédentes ayant identifié trois parties caractéristiques (Huguet et al., 2009).

La combinaison de différentes techniques analytiques couplées ensuite avec des approches statistiques a donc permis une étude plus fine et détaillée de la MOD en milieu naturel notamment dans le cas d'environnements complexes tels que l'estuaire de la Gironde.

Dans une deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'étude de la dynamique de la MOD le long de l'estuaire de la Seine. Dans un premier temps, l'étude a plus particulièrement porté sur l'effet de la marée (pleine mer, jusant et basse mer) sur la MOD le long du continuum rivière-océan pendant une période hivernale. Des changements de MOD significatifs ont été observés entre la Seine et la Baie de Seine. L'étude de la taille, des sources, concentrations et types de MOD montre que les apports en eaux douces peuvent être considérés comme les principales sources de MOD pendant cette période.



Cependant il apparaît que les mélanges des eaux douces et marines ne sont pas les seuls contributeurs à l'évolution de la MOD dans l'estuaire de Seine. Le contexte hydrologique et les processus internes (floculation, activités microbiennes, photodégradation,...) de cet estuaire peuvent également jouer un rôle. Mais avec les données disponibles actuellement il est difficile de cibler un processus en particulier.

L'utilisation de différentes approches statistiques a permis de mettre en avant des différences significatives dans les caractéristiques de la MOD entre les différents sites de prélèvement et positions de marée. Les paramètres de la MODC apparaissent comme de bons outils pour discriminer les différentes sources de MOD alors que la taille semble être un excellent indicateur de la dynamique de la MOD. Les analyses en composantes principales, les tests de comparaison ainsi que les tests de corrélation de Spearman se sont donc avérés être des outils efficaces dans l'étude de la dynamique de la MOD en milieu naturel complexe. Dans l'estuaire de Seine, la MOD change donc de taille, de nature et de type entre l'amont (MOD plus allochtone) et l'aval (MOD plus autochtone), ce qui traduit bien une production et/ou la transformation de MOD dans l'estuaire pendant cette période.

Dans un deuxième temps, l'objectif a été de voir l'effet de la saisonnalité sur les qualités et quantités de MOD dans l'estuaire de Seine à l'aide des mêmes outils analytiques (AF4-UV, spectrométrie UV/Vis et de fluorescence) en utilisant des approches statistiques innovantes et complémentaires pour l'étude de la MOD naturelle.

Le long du continuum entre le fleuve de la Seine et la Baie de Seine, l'étude de la MOD en conditions estivale et hivernale (septembre 2015 et avril 2016) a montré un effet significatif de la saisonnalité. L'ensemble des approches statistiques utilisées mettent en avant des différences entre ces deux saisons. Ainsi l'hiver est caractérisé par de forts apports fluviaux (lié au débit de la Seine) avec des eaux plus chaudes. L'étude par modèle de régression linéaire multiple et par corrélations de Spearman a montré que les deux principaux facteurs influençant les caractéristiques de la MOD à cette période étaient le mélange des eaux douces et marines et la température de l'eau qui pouvait être considérée comme un descripteur de la variation de la MOD, notamment en ce qui concerne les apports liés à l'activité biologique.

La période estivale, caractérisée par de faibles débits de la Seine sans différence dans les températures des eaux, est propice à une MOD moins influencée par les apports fluviaux et avec une production autochtone plus importante. De plus l'analyse PARAFAC a permis de mettre en avant de potentiels apports anthropiques en provenance d'usine de pâte à papier pendant cette période. Le couplage de PARAFAC avec l'approche de cartes auto-adaptatives (SOM) permet de mieux comprendre et expliquer la dynamique de la MOD dans l'estuaire en fonction des deux saisons, trois périodes de la marée et

des profondeurs. Il est clair que la saison et la marée ont des effets significatifs sur le type de MOD et donc sur son évolution.

L'ultime objectif a été de coupler différentes approches statistiques afin de mieux appréhender les multiples variables permettant de caractériser et étudier la MOD par AF4-UV, spectrométrie UV/VIS et de fluorescence. Des techniques de statistiques classiques comme l'analyse en composantes principales, corrélations de Spearman, tests de Student ou de Kruskal-Wallis, une analyse factorielle parallèle (PARAFAC) spécifique à la fluorescence 3D de la MOD et l'utilisation des cartes auto-adaptatives de Kohonen ont été appliqués dans ces travaux.

L'ensemble de ces travaux ont donc permis d'obtenir une méthode analytique par AF4 pour la séparation de la MOD naturelle et sa mise en œuvre dans l'étude de sa dynamique en milieux estuariens. Les compétences et connaissances acquises pendant cette thèse permettront de mieux caractériser la MOD et sa dynamique dans des environnements aquatiques variés.

En perspective il serait intéressant dans un premier temps de continuer le développement de l'étude de la MOD par AF4 en multipliant notamment les détecteurs possibles en couplages (fluorescence, détecteur à barrettes diodes, refractomètre, diffusion de lumière (MALLS, spectrométrie de masse en ligne...) pour une caractérisation permettant d'obtenir des informations complémentaires sur le type ou la forme des molécules en fonction de la taille.

Ainsi il serait possible de mieux appréhender les questions autour des liens entre la taille et les types de MOD. De plus l'utilisation du fractionnement en gamme de tailles des échantillons naturels de MOD, présenté dans ces travaux, permettrait l'application d'analyses directes sur les fractions telles que la fluorescence, l'absorbance, l'analyse de lumière dynamique (DLS) voir des techniques de spectrométrie de masse.

L'application du fractionnement de la MOD en fonction de la taille par AF4 pourrait également permettre l'étude des interactions MOD-contaminants et ainsi de définir des liens entre des tailles/types/structures de MOD et des contaminants spécifiques.

Par la suite, il serait intéressant de pouvoir combiner l'étude de la MOD par mesure d'absorbance, de fluorescence et par mesure de la taille en AF4, comme réalisé dans ces travaux de thèse, avec des techniques renseignant sur les structures chimiques et moléculaires et plus particulièrement la spectrométrie de masse ultra-haute résolution. Ainsi la combinaison de l'ensemble de ces outils analytiques permettrait d'obtenir une caractérisation plus fine de la MOD et donc d'augmenter le nombre de variables descriptives.

Il paraît d'autre part primordial de poursuivre le travail sur les approches statistiques permettant d'utiliser pleinement les données analytiques, notamment les cartes de Kohonen (SOM) dans le cadre d'étude sur la dynamique de la MOD.





# Annexes

*Annexe 1*

Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation of white wine chromophoric  
colloidal matter

Accepted in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

Christian Coelho<sup>1</sup>, Jérémie Parot<sup>2,3</sup>, Michael Gonsior<sup>4</sup>, Maria Nikolantonaki<sup>1</sup>, Philippe Schmitt-Kopplin<sup>5,6</sup>, Edith Parlanti<sup>2,3</sup>, Régis D. Gougeon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *UMR PAM Université de Bourgogne/AgroSupDijon, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Dijon, France*

<sup>2</sup> *Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, LPTC, F-33400 Talence, France*

<sup>3</sup> *CNRS, UMR 5805, EPOC, LPTC, F-33400 Talence, France*

<sup>4</sup> *University of Maryland Center for Environmental Science, Chesapeake Biological Laboratory, Solomons, Maryland 20688, United States*

<sup>5</sup> *Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Ingolstaedter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg, Germany*

<sup>6</sup> *Chair of Analytical Food Chemistry, Technische Universität München, Alte Akademie 10, 85354 Freising-Weihenstephan, Germany.*

\*Corresponding author: [christian.coelho@u-bourgogne.fr](mailto:christian.coelho@u-bourgogne.fr)

**Abstract:**

Two analytical separation methods: size exclusion chromatography and asymmetrical flow field-flow fractionation were implemented to evaluate the integrity of the colloidal composition of Chardonnay white wine and the impact of pressing and fermentations on final macromolecular composition. Wine chromophoric colloidal matter, representing UV-visible absorbing wine macromolecules, was valued by optical and structural measurements combined to the description of elution profiles obtained by both separative techniques. The objective of this study was to apply these two types of fractionation on a typical Chardonnay white wine elaborated in Burgundy and to evaluate how each of them impacted the determination of the macromolecular chromophoric content of wine. UV-visible and fluorescence measurements of collected fractions were successfully applied. An additional proteomic study revealed that grape and microorganism proteins largely impacted the composition of chromophoric colloidal matter of Chardonnay wines.

Asymmetrical flow field-flow fractionation appeared to be more reliable and less invasive with respects to the native chemical environment of chromophoric wine macromolecules and hence is recommended as a tool to fractionate chromophoric colloidal matter in white wines.

**Keywords:** Asymmetrical field flow-field fractionation, white wine, chromophoric colloidal matter, wine proteins



## I. Introduction

Polysaccharides and proteins are the two main classes of macromolecules present in wine. They are released in wine after enzymatic digestions of microorganisms or from the grape berry cell walls. In the final alcoholic beverage, macromolecules impact qualitative and sensorial wine properties (1). This colloidal fraction interacts with wine compounds like polyphenols participating to aggregation reactions (2,3) and wine flavour compounds containing esters and carbonyl functions modifying their volatility and solubility in wine (4,5). During white wine making, fining can be used to reduce the concentration of heat-unstable proteins in order to prevent the formation of a hazy suspension, which is undesirable for the consumer (6, 7). Grape thaumatin-like proteins and chitinases have been found to participate in the formation of haze in white wine (8). These pathogenesis related proteins accumulate in the grape berry during grape maturation (9). The levels of mildew infections on grapes increase chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase activity and putative gene products coding for pathogen-related proteins (10). Mechanical harvesting has also been found to increase the amount of final protein contents in musts and wines, because of a reduced extraction of polyphenols from grape stalks, which are considered to bind to proteins and form precipitates (11, 12). This mechanism is usually considered for explaining the low concentration of proteins in red wines.

The action of allochthonous or indigenous enzymes during maceration or alcoholic fermentation degrades the polymeric chains of grape polysaccharides and changes the colloidal composition of wine (13, 14). Glucanase-based commercial preparations are known to accelerate yeast autolysis, and liberate mannoproteins from yeast walls (15). Mannoproteins have been shown to increase colloidal stability (13), stabilize the thermally instable proteins (16), prevent the tartaric acid precipitation in white wines (for certain concentrations) (17-19), inhibit grape seed tannin aggregation (20), modulate oxygen consumption (21), influence the foaming properties of sparkling wine (22) and increase the bacterial growth after the alcoholic fermentation (23). During ageing of lees, the macromolecular fraction of wine is thus modified by an input of mannoproteins and a structural modification of grape native arabinogalactan proteins (24). Undoubtedly, the wine stability in terms of color and phenolic content is conditioned by the presence of wine macromolecules (25, 26). The chemical complexes resulting from the association between the colored wine phenolics and wine macromolecules are referred to as chromophoric colloidal matter of wine.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was one of the first strategies employed to evaluate the wine proteins composition, separating wine macromolecules according to their electrophoretic mobility and molecular weight (27-29). 2D-PAGE affords an additional separation in terms of pH, which is of interest for wine proteins given the isoelectric points range from

4.1 to 5.8 (30). Rapidly, gel permeation columns coupled to a UV-detector at 280 nm enabled characterizing quantitatively and qualitatively wine compounds absorbing at 280 nm, and representing both wine proteins and polyphenols (31). The principle was based on the elution of the smallest molecular weight compounds across the micrometric pores, the higher ones being excluded, which finally led to size exclusion chromatography. Since then, numerous characterizations of the wine chromophoric colloidal matter were published (32-37). The same methodology was successfully applied to other complex systems like tea (38), plasma (39), brain tissues (40), activated sludge (41) and natural organic matter (42, 43).

In this paper, size exclusion chromatography (SEC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) were compared for their efficiency in characterizing Chardonnay wine chromophoric macromolecules. The novelty consisted in separating wine colloids by AF4 presenting the advantage, compared to SEC, to avoid possible interaction with a stationary phase. Its principle was based on the differentiation of macromolecules diffusion properties once submitted to a cross flow, perpendicular to the longitudinal elution flow. Colloidal diffusion coefficients could be theoretically calculated and related to their size, their conformation and their average molecular weight (44, 45). The use of a cellulose or polyethersulfone ultrafiltration membrane enabled targeting of a specific range of molecular weights. Except for the quantification and characterization of yeast cells size- distribution (46-49), such a strategy has never been devoted to study the colloidal matter of wine. Previous studies conducted in polymeric suspensions and comparing asymmetrical flow field-flow fractionation and size exclusion chromatography, revealed a better selectivity and resolution for the first technique, and the combination of both fractionation systems exhibited an increased efficiency for its characterization (50) and the possibility of studying metal speciation in natural humic substance complexes (51). Asymmetrical flow field-flow fractionation has been used to describe chromophoric dissolved organic matter (52-55), the evolution of absorbing metallic nanoparticles in environmental systems (56,57) and the study of protein aggregation mechanisms (58,59). Recently AF4, has been proposed as a lab-bench system, to investigate the size distribution of tannins during condensation reactions (60). AF4 has also been applied to assess the colloidal speciation of copper in drain waters from a wine growing area (61).

In this study, we monitored the chromophoric colloidal matter from Chardonnay wine with the UV detection set at 280 nm and a refractive index detector. Both were interfaced with SEC and AF4 to determine wine proteins and polysaccharide fractions, respectively. The resulting chromatograms and fractograms are discussed in terms of chromophoric colloidal content along the process of elaboration of a Chardonnay white wine. A total of six fractions, with distinct molecular weights, were collected by

each separation technique. Chromophoric colloidal matter from white wine was characterized in terms of UV-visible, fluorescence spectra and proteomic analysis.

## **II. Experimental**

### **1. Materials**

Three samples were collected along the elaboration of a Chardonnay white wine after the pressing stage (PR), post alcoholic fermentation (AF) and post malolactic fermentation (MLF) during the 2013 vintage.

Must and wine colloidal matter were precipitated with cold ethanol for 24h at 4°C following the original Gaillard procedure (62) and recently optimized in wine studies (1, 14). This procedure has been commonly used to isolate and quantify the cross-linked polymers from grape primary cell walls larger than 3kDa in must and wine samples (14). The precipitate was then centrifuged at 7000 rpm and rinsed three times with ethanol. The resulting precipitate was dissolved in ultrapure water in order to obtain the same amount of colloidal matter that has been present in the original samples.

The quantification of polysaccharide and protein contents was evaluated by the phenol sulphuric (63) and the Bradford methodologies (64), respectively. The polyphenol contents of the must and wine samples were measured using the TPI index, which corresponds to the 280 nm absorbance value, after dilution (65). Evaluation of current analysis on polyphenols from grapes and wines have recently been reviewed (66).

### **2. Experimentation**

#### **2.1. Fractionation procedures**

The size exclusion chromatography was run on a VWR chromatographic system, equipped with a TSKgel column with molecular cut-offs between 5kDa and 250 kDa in our operating conditions. The linear calibration was estimated using aqueous solutions of 1 g.L<sup>-1</sup> of dextran standards (Sigma Aldrich) from *Leuconostoc mesenteroides*, with molecular weight varying from 5 kDa to 440 kDa. The mobile phase was composed of a 1 mM aqueous solution of NaNO<sub>3</sub>. Flow rate was fixed at 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. 20 µL of samples were injected in the chromatographic system. The detection system was composed of a VWR Hitachi L-2455 diode array detector with a fixed wavelength at 280 nm and a Spectra System RI-150 refractometer.

The asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) system, used in this study, was an Eclipse 3 (Wyatt Technology, Dernbach, Germany). The trapezoidal channel was 14.5 cm in length and 0.6 and 2.1 cm in width. Flow rates were controlled using an Agilent Technologies 1200 series isocratic pump, equipped with a micro-vacuum degasser. This system was coupled to a UV detector set at 280 nm (Agilent) and a refractometer (Optilab T-rEX Refractive Index Detector, Wyatt Technology, Dernbach, Germany). The experimental conditions were optimized using 1 mM NaNO<sub>3</sub> mobile phase. The channel was equipped with a 350 µm spacer and a semi-permeable cellulose membrane with a molecular weight cut-off of 5 kDa. (Wyatt Technology, Dernbach, Germany). 1.2 mL of each sample was injected into the 1 mL sample loop during the 5 minutes (focussing + injection) step characterized by a 0.2 mL.min<sup>-1</sup> injection flow rate and a 2 mL.min<sup>-1</sup> focus flow rate. A following focusing step was run for the next 4 minutes at a focus flow rate of 2 mL.min<sup>-1</sup> before eluting the sample, which resulted in 9 minutes delay before the start of elution. Then the cross flow was set constant at 1.2 mL.min<sup>-1</sup> during 19 minutes of elution step and detector flow rate was set at 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. The calibration of AF4 was carried out with the same dextran standards as for SEC, molecular weight varying from 5 kDa to 440 kDa.

Both fractionation methodologies were undertaken in order to collect the colloidal matter of must and wine. A total of six fractions were collected from both methods for further analyses. Three additional bottled Chardonnay wines from 2014 vintage that realized MLF were opened for AF4 measurement. Table 1 outlines the samples and their treatments that were analysed in this study.

Considering the implemented fractionation methodologies, it is important to precise that a very large proportion of the colloidal material is likely to be lost by the exclusion of the SEC column and the pores of the 5 kDa separation membrane used in AF4. Additionally, the dextran calibration that was realized for both AF4 and SEC, implies that the relationship between diffusion coefficient (and hence size) and molecular weight that depends on the molecular conformation, must be the same for both wine sample and dextran calibration standards.

*Table 1 : List of samples and treatments carried on Chardonnay must obtained after grape pressing (PR) and white wine collected after alcoholic fermentation (AF) and malolactic fermentation (MLF).*

<b>Vintage</b>	<b>Appellation</b>	<b>Winemaker</b>	<b>Wine elaboration stage analysis</b>
2013	Chablis	Domaine Drouhin Vaudon	PR, AF, MLF and respective colloids following Gaillard procedure (62)
2014	Marsannay	Domaine expérimental de l'Université de Bourgogne	MLF
2014	Macon Lugny	Cave Coopérative de Lugny	MLF
2014	Mercurey	Domaine Belleville	MFL

## 2.2. Characterization of Colloidal Chromophoric Matter

UV-visible absorbance spectra and fluorescence spectra of wine, ethanolic extracts and fractions were recorded on a UV-1800 Shimadzu in a 1-cm pathlength quartz cell and an Aqualog (Horiba Jobin Yvon, Inc.) system for excitation wavelengths ranging from 225 to 600 nm (3 nm interval) and emission wavelengths spanning from 230 to 600 nm with a 3.22 nm CCD bin increment at medium gain and 0.1s integration. All Excitation-Emission Matrices were corrected by an ultrapure water blank subtraction, followed by Rayleigh and Raman scatterings masking, and inner filter effects corrections using the functions provided by the Aqualog software (67). White wines and collected fractions were accurately diluted in order to minimize inner filter effects, as previously described (68). The fluorescence intensity was normalized to a Starna 1 ppm quinine sulphate reference cell.

The protein content of wine was determined using a nanoLC/ESI-Trap (Orbitrap ELITE, ThermoScientific) with a previous tris(2- carboxyethyl)phosphine reduction, iodoacetamide alkylation and trypsin digestion of wine proteins. The method was described elsewhere (69). Resulting peptides were analysed in the range between 400 and 1700 m/z and identified via Mascot using the NCBI databank for *vitis vinifera*, *saccharomyces cerevisiae* and *oenococcus oeni*.

## III. Results and discussion

### 1. Global characterization

Chardonnay macromolecular and polyphenol content were evaluated after the pressing step (PR), the alcoholic fermentation (AF) and the malolactic fermentation (MLF) and results are presented in Figure 1A. TPI values varied from 7.0 to 8.9, which is in agreement with Chardonnay white wines (65). TPI values decreased from the must to the wine post-AF, indicating a loss of polyphenols due to precipitation reactions. TPI increased after the malolactic fermentation, thus revealing a release of certain class of polyphenols belonging to the cinnamic family into the wine, hypothetically due to an enzymatic activity of lactic bacteria, especially cinnamoyl esterase which was previously proposed (67). When analysed chemically for their colloidal contents, grape and wine polysaccharides were quantified to be between 142 to 174 mg.L<sup>-1</sup>. The protein content varied from 212 to 253 mg.L<sup>-1</sup>. Polysaccharide and protein contents evolved differently throughout the winemaking process: a decreasing of 18 % for polysaccharides and increasing of 19 % for proteins. These peculiar trends over the course PR →AF →MLF could be explained by various reactions like hydrolysis, enzymatic or precipitation reactions

leading to the lost of macromolecular compounds (28,70,71) and by wine microorganisms activity releasing yeast proteinaceous metabolites in the wine media (72).

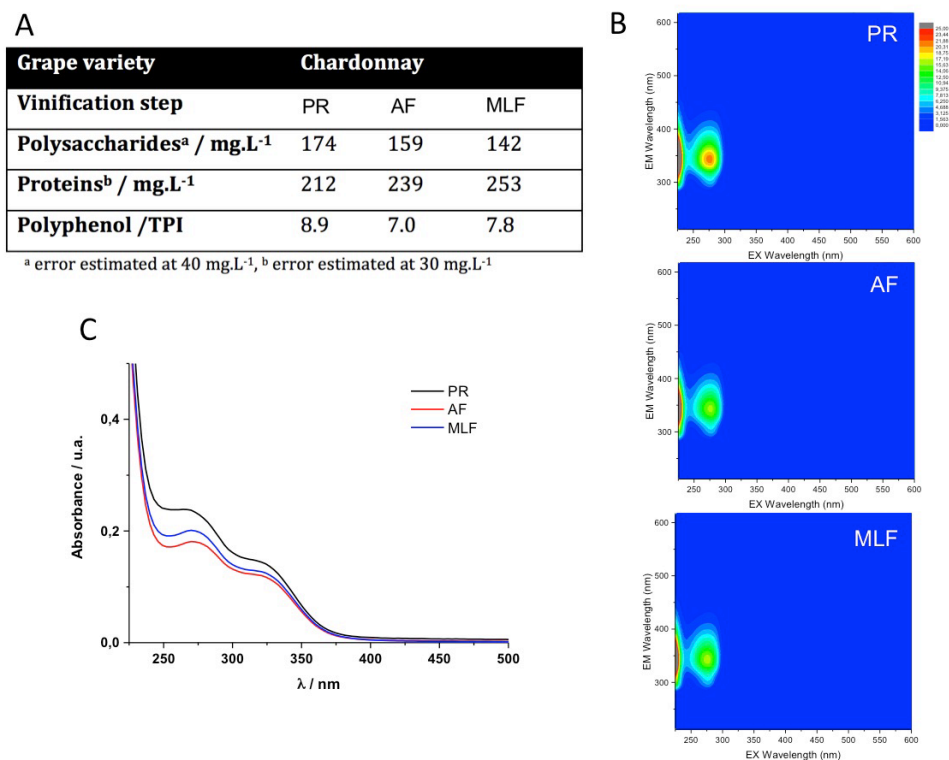


Figure 1: Macromolecular content and TPI measurements (A) and Spectroscopic characterizations obtained by Excitation Emission matrix of fluorescence (B) and UV-visible absorbance spectra (C) of Chardonnay must (PR), post-alcoholic fermentation wine (AF) and post-malolactic fermentation wine (MLF).

## 2. UV-visible and fluorescence spectra of colloidal contents

UV-visible spectra followed an exponential decrease, but also showed two distinct shoulders in must and wine samples at 265 nm and 320 nm (Fig. 1B). These shoulders might be attributed to electronic  $n-\pi^*$  and  $\pi-\pi^*$  transitions of molecular and macromolecular structures containing amino, hydroxylated and phenolic moieties (66). The absorbance at 270 nm usually corresponded to the absorption of wine phenolic compounds and 320 nm was generally attributed to cinnamic-derived structures. Some aromatic amino acids could also act as 270 nm absorbing compounds (66, 73).

The comparison of UV-visible spectra at different steps of the white wine elaboration process indicated a similar composition in terms of chromophoric constituents present in Chardonnay must and wines. Most of these chromophores should be present in their free forms, but some might be bound to macromolecules from grapes or microorganisms that were extracted and released during vinification. In order to characterize wine chromophoric colloidal content, excitation emission matrices (EEMs) were recorded (Fig. 1C). Recently it was shown that a Chardonnay white wine parallel factor analysis (PARAFAC) model could describe white wine EEMs by a trilinear decomposition into four statistical

components (68). EEMs could thus explore the chemical diversity of wine fluorescence. Two protein-like components with an excitation wavelength of 280 nm and emission wavelengths centered at 305 nm and another at 320 nm and a third component with a 280 nm excitation wavelength, spanning the range of emission wavelengths from 330 to 370 nm, contributed to the fluorescence of white wines. As can be shown in Figure 1C, one of the two protein-like component (Ex 280 nm/ Em 320 nm) dominated the total fluorescence of the three analysed samples during white wine elaboration process.

Due to the complexity of white wine fluorophores that should present several overlapping spectral bands in EEMs, we decided to fractionate white wine chromophoric colloidal matter in order to identify macromolecular chromophores implicated in absorbing and emitting properties.

### **3. Chromophoric colloidal matter fractionation**

Macromolecular matter has been analysed in ethanolic precipitated extracts and post-MLF wines from Chardonnay by size exclusion chromatography and AF4 (Fig. 2). The molecular weight distributions for both samples were similar, meaning that either extracted samples or crude samples, containing the same group of wine colloidal compounds, could be used for analyzing the colloidal matter of musts or wines. Both fractionating procedures led to six easily distinguishable fractions of Chardonnay wine colloidal matter, hereafter referred to as fractions I, II, III, IV, V and VI. Their molecular weights spanned from 5-10 kDa, 10-25 kDa, 30-60 kDa, 70-120 kDa, 150-250 kDa and higher than 250 kDa, respectively. These fractions should gather grape polysaccharides and yeast autolysis macro metabolites. They resulted from the combined SEC and AF4 elution profiles coupled to both UV and RI detections.

Refractometer was an ideal detector used for targeting compounds such as grape acidic or neutral polysaccharides and some glycosylated proteins and particularly mannoproteins originating from lysated yeast lees, with molecular weights exceeding 250 kDa. (74, 24, 14, 25, 13). These macromolecular entities containing chromophoric compounds were easily detected using a UV detector set at 280 nm, as well as other grape proteins such as thaumatine-like proteins, chitinases invertases and other classes of grape or microorganism enzymes (75, 76).

UV detection combined with size exclusion chromatography did not show good results and visualization of the chromophoric content in white wines was difficult, which was not the case when AF4 was used for the same samples. The retention of wine chromophores by the stationary phase of SEC could be another reason for the weak UV detection. However, the fractions I and II, comprising compounds from 5 kDa to 25 kDa, showed most of the 280 nm absorbing moieties of the wine chromophoric colloidal compounds. Such observations were in agreement with previous results (77).

Interestingly, AF4 fractionated white wine differently when compared to SEC. Wine fractograms were rather complex indicating the large continuum of molecular sizes. They never return to baseline until the cross flow is maintained. Once the cross flow was tuned off, a release peak could be visible after 30 minutes (not shown here). The void peak is only detected at 13.5 min. when UV detection was coupled to AF4. Fraction III, characterized by molecular weight spanning from 30 to 60 kDa dominated the chromophoric colloidal content of analysed white wines.

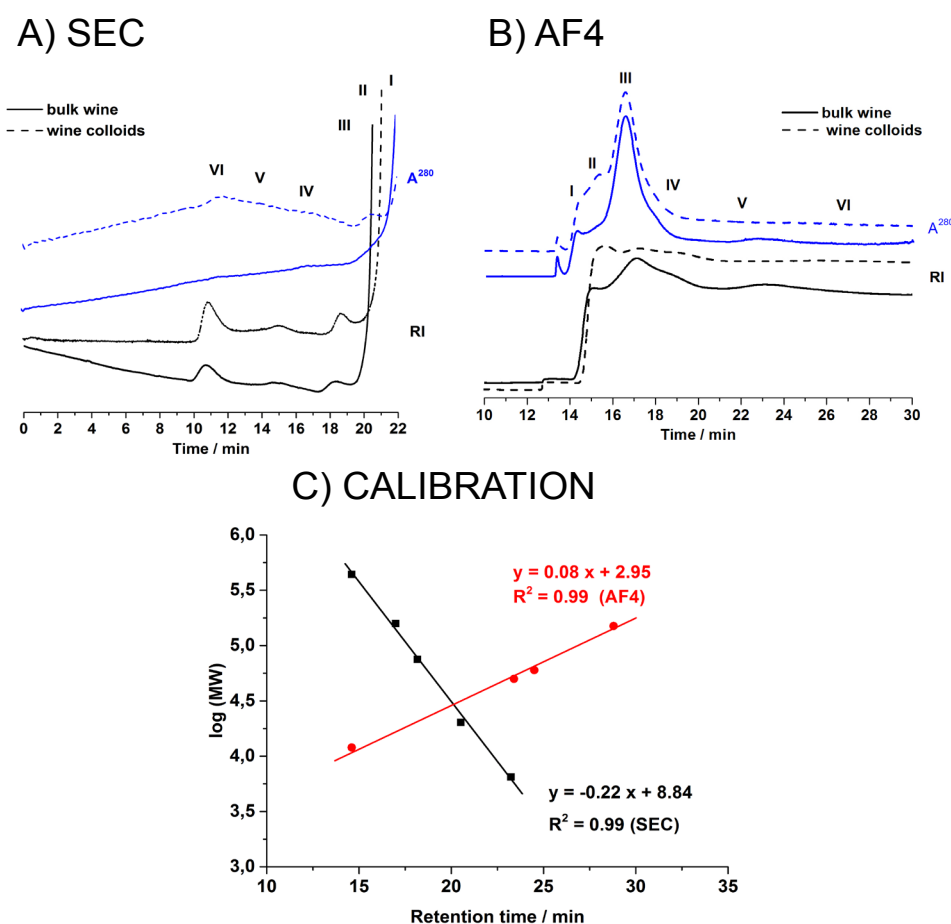


Figure 2: Size exclusion chromatograms (A) and Fractograms (B) of Chardonnay post-MLF white wine (solid line) and its ethanolic precipitated extract (dashed line) obtained with a refractometer (black lines) and a UV-visible detector (blue lines) working at 280 nm. Six wine collected colloidal fractions are referred as I, II, III, IV, V and VI. Calibration curves obtained by SEC and AF4 under the operating conditions described in Experimental section (C).

#### 4. Chromophoric colloidal matter across Chardonnay wine elaboration

As illustrated in Figure 3, each stage of Chardonnay winemaking was characterized by the abundant presence of fraction III, which was observed initially in the must at grape pressing and was still present after the fermentation steps. We suggest that chromophoric macromolecules might have originated from harvested Chardonnay grapes. If this was the case, the slight increase in fraction III, post-AF and post-MLF, could be associated to wine microorganisms metabolic pathways interacting with native



grape macromolecules and changing their contribution to the fractogram profiles. In order to validate this hypothesis, we evaluated three other bottled Chardonnay white wines fractograms. Fraction III appeared once again to be systematically present, but it was not necessarily the dominant absorbing colloidal material in bottled white wines, as shown for wines 2 and 3 containing mainly fraction II (Fig. 3). This meant that the dynamics of chromophoric colloidal matter across wine elaboration was rather complex and AF4 allowed us to point out precisely these absorbing macromolecular contributions.

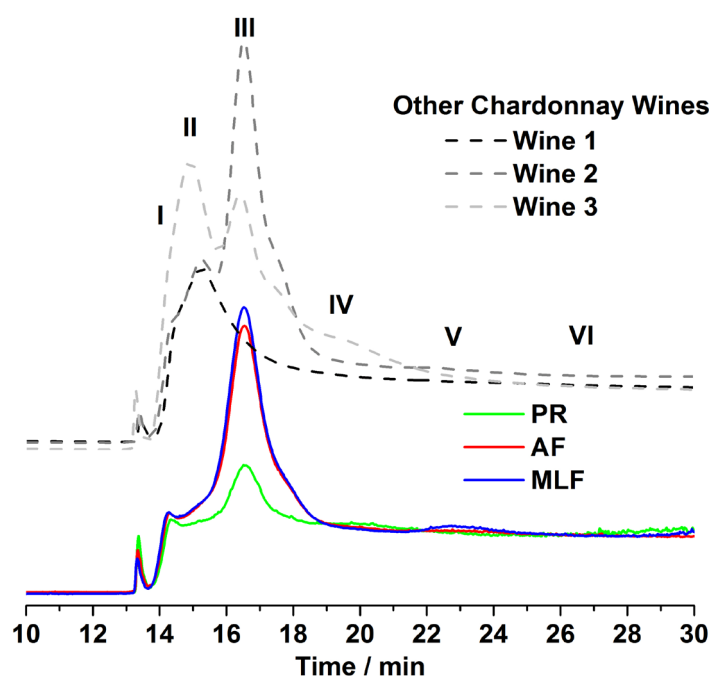


Figure 3: Fractograms obtained at each step of the Chardonnay winemaking process (colored lines) and fractograms of three other Burgundian Chardonnay wines (dashed black lines). UV detector set at 280 nm.

## 5. Fraction III characterization

We collected each fraction but focused on the characterization of fraction III, which showed an abundant absorbing material in the post-MLF Chardonnay white wine. The absorbance and fluorescence properties, assessed respectively by UV-visible and EEM spectra, are given in Figure 4A and B.

UV-spectra of fraction III showed a clear absorption band located at 270 nm when fractionated by AF4, whereas this band appeared more like a shoulder when fractionated via SEC. Such observation was in agreement with our lack of separation, and visualization of wine chromophoric macromolecules separated by SEC with a detection set at 280 nm. The absorption shoulder located at 310 nm in both fraction III spectra was presumably caused by the absorption of nitrate ion used in the mobile phase

at the concentration of 1 mM in each case. Unfortunately, absorption of wine macromolecular chromophores in this area was masked by the absorption of the eluent.

Interestingly, fraction III, separated by AF4, showed an intense emission between a narrow area of excitation and emission wavelengths centered at 280 nm and 300 nm respectively, corresponding to tyrosine-like residues (proteinaceous structures), which was previously proposed for wine samples (68) and dissolved organic matter (78). This protein-like emission is also present in the SEC-separated fraction III, but present an additional dominant emission band centered at 300 nm with excitation wavelengths ranging from 225 and 230 nm, already present in the fluorescence of post-MLF wine (Fig. 1B), suggesting that the chemical composition differed from the AF4-separated fraction.

As a possible explanation, we propose that AF4 is a gentler fractionation tool compared to SEC and does not show any possible interactions with a stationary phase. It also kept the original molecular structure more intact and showed a lower impact on the environment of wine chromophoric colloidal matter. This observation was of primordial importance when characterizing macromolecular constituents of wine and in evaluating the impact of oenological processes on the characteristics of wine colloidal matter dynamics.

Additionally, a proteomic study, carried out on post-MLF Chardonnay white wine, elucidated the protein composition of fraction III. Figure 4C indicated that the ten most abundant wine proteins were present in the range of size of fraction III. Two of the most recovered proteins (more than 50 %) belonged to the same family of beta- glucosidases and originated from *vitis vinifera* grapes and *saccharomyces cerevisiae* yeasts. Beta-glucosidases are enzymes that are related to aroma formation during the elaboration of wine (79) releasing glycosylated aroma precursors. It has been recently shown that  $\beta$ -glucosidase could completely be removed by fining with bentonite due to its special chemical structure (80). Such oenological practice, susceptible to occur during winemaking, and particularly on white wines in order to prevent haze formation, could explain the dynamics of chromophoric colloidal content during white wine elaboration steps.

Other proteins from *saccharomyces cerevisiae* and *oenococcus oeni* also contributed to the wine macromolecular content in fraction III (Fig. 4C).

AF4 enabled a much more effective for describing the diversity of absorbing macromolecules of Chardonnay white wines and was able to depict relative contributions of absorbing macromolecules from plant and microbiological origin.

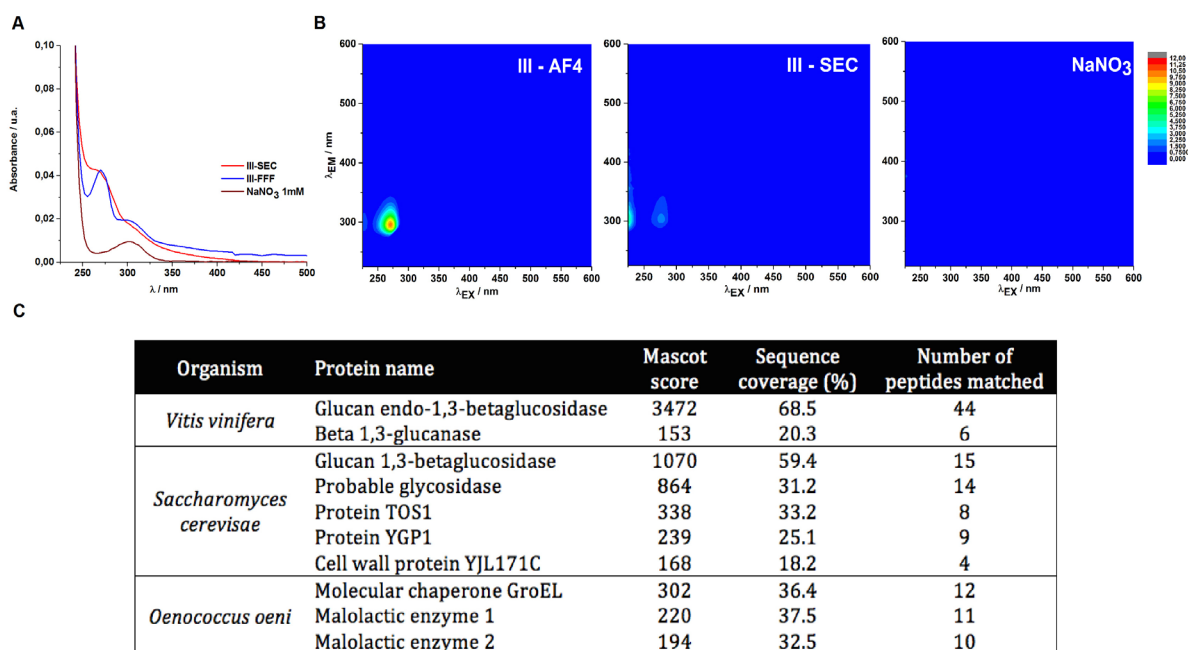


Figure 4: Fraction III from post-MLF Chardonnay wine spectroscopic parameters: UV-visible spectra (A) and Excitation Emission Matrix of Fluorescence (B) and possible protein content of Fraction III obtained by the analysis of post-MLF wine proteins ranging in molecular weights from 30 to 60 kDa (C).

## IV. Conclusions

SEC and AF4 were compared in terms of their fractioning potential to discriminate Chardonnay white wine colloids. In each case, six fractions appeared to fully describe the macromolecular content of bulk wine. We focused on the chromophoric colloidal matter of white wine and AF4 with a UV detection set at 280 nm. AF4 fractograms appeared to be much more detailed in absorbing macromolecular diversity compared to SEC. Fractograms acquired along the vinification steps of a Chardonnay white wine were closely related. They were characterized by a dominant macromolecular chromophoric fraction III, with molecular weights ranging from 30 to 60 kDa. This colloidal fraction, collected by AF4, showed a clear absorbance band centered at 270 nm and an emission fluorescence peak at 300 nm, typical of the fluorescence of wine proteins. Wine protein analyses suggested that  $\beta$ -glucosidases from grape and yeasts dominated wine chromophoric colloidal matter. The dynamics of the chromophoric colloidal content of wine during its elaboration could be in the future better assessed by AF4, and combined with other spectral characterizations, as illustrated in this study.

## Aknowledgements

For this study, we would like to personally thank Hugues Mathieu who kindly carried Chardonnay winemaking processes, at the Domaine Joseph Drouhin. Thanks to Geraldine Lucchi from Clipp platform for carrying out proteomic analysis on Chardonnay white wine. We are also grateful for the FABER financial support from the Burgundy region. This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

## References

1. Vidal S, Williams P, Doco T, Moutounet M, Pellerin P (2003) The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydr Polym* 54,439-447.
2. Riou V, Vernhet A, Doco T, Moutounet M (2001) Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 16, 17-23.
3. Cheynier V, Dueñas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet J-M, Sarni-Manchado P, Fulcrand H (2006) Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* 57,298-305.
4. Pozo-Bayón M, Reineccius G (2009) Interactions Between Wine Matrix Macro-Components and Aroma Compounds. In: Moreno-Arribas MV, Polo MC (eds) *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York, pp 417-435. Doi:10.1007/978-0-387-74118-5\_19
5. Voilley A, Lubbers S (1998) Flavor- matrix interactions in wine. *ACS Symp Ser* 714,217-229.
6. Pocock KF, Waters EJ (2006) Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12,212-220.
7. Pocock KF, Salazar FN, Waters EJ (2011) The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17,280-284.
8. Marangon M, Van Sluyter SC, Neilson KA, Chan C, Haynes PA, Waters EJ, Falconer RJ (2010) Roles of Grape Thaumatin-like Protein and Chitinase in White Wine Haze Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59,733-740.
9. Pocock KF, Hayasaka Y, McCarthy MG, Waters EJ (2000) Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze- forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *J Agric Food Chem* 48,1637- 1643.
10. Jacobs, Dry, Robinson (1999) Induction of different pathogenesis- related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* 48,325-336.
11. Paetzold M, Dulau, L., Dubourdieu, D. (1990) Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisin blancs. *J Int Sci Vigne Vin* 24,13-28.
12. Pocock KF, Hayasaka Y, Peng Z, Williams PJ, Waters EJ (1998) The effect of mechanical harvesting and long- distance transport on the concentration of haze-forming proteins in grape juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4,23-29.
13. Guadalupe Z, Palacios A, Ayestaran B (2007) Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J Agric Food Chem* 55,4854-4862.
14. Ayestaran B, Guadalupe Z, Leon D (2004) Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal Chim Acta* 513,29-39.

15. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16,675-729.
16. Waters EJ, Alexander G, Muhlack R, Pocock KF, Colby C, O'Neill BK, HØJ PB, Jones P (2005) Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11,215- 225.
17. Lubbers S, Leger B, Charpentier C, Feuillat M (1993) Colloid-stabilizing effect of yeast cell-wall extracts with respect to tartrate precipitation in an ethanolic model solution. *J Int Sci Vigne Vin* 27,13-22.
18. Moine-Ledoux V, Dubourdieu D (2002) The role of yeast mannoproteins in the tartaric stabilization of wines. *Bull OIV* 75,471-482.
19. Rodrigues A, Ricardo-Da-Silva JM, Lucas C, Laureano O (2012) Influence of fining and tartaric stabilisation procedures on white wine mannoprotein content. *S Afr J Enol Vitic* 33,88-94.
20. Poncet-Legrand C, Doco T, Williams P, Vernhet A (2007) Inhibition of Grape Seed Tannin Aggregation by Wine Mannoproteins: Effect of Polysaccharide Molecular Weight. *American Journal of Enology and Viticulture* 58,87-91.
21. Salmon JM, Fornairon-Bonnefond C, Mazaauric JP, Moutounet M (2000) Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing. *Food Chem* 71,519-528.
22. Alexandre H, Guilloux-Benatier M (2006) Yeast autolysis in sparkling wine- a review. *Aust J Grape Wine Res* 12,119-127.
23. Guilloux-Benatier M, Guerreau J, Feuillat M (1995) Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Am J Enol Vitic* 46,486-492.
24. Doco T, Vuchot P, Cheyrier V, Moutounet M (2003) Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *Am J Enol Vitic* 54,150-157.
25. Fernandez O, Martinez O, Hernandez Z, Guadalupe Z, Ayestaran B (2011) Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Res Int* 44,84-91.
26. Palomero F, Morata A, Benito S, Gonzalez MC, Suarez-Lepe JA (2007) Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chem* 105,838-846.
27. Berg HW, Akiyoshi M (1961) Determination of Protein Stability in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 12,107-110.
28. Bayly FC, Berg HW (1967) Grape and Wine Proteins of White Wine Varietals. *American Journal of Enology and Viticulture* 18,18-32.
29. Van Vuuren HJJ, Van Der Meer L (1987) Fingerprinting of Yeasts by Protein Electrophoresis. *American Journal of Enology and Viticulture* 38,49-53.
30. Hsu JC, Heatherbell DA (1987) Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *Am J Enol Vitic* 38,6-10.
31. Somers TC, Ziemelis G (1973) Direct Determination of Wine Proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 24,47-50.
32. Tyson PJ, Luis ES, Day WR, Walker B, Lee TH (1981) Estimation of soluble protein in must and wine by high- performance liquid chromatography. *Am J Enol Vitic* 32,241-243.
33. Pellerin P, Vidal S, Williams P, Brillouet JM (1995) Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydr Res* 277,135-143.
34. Gonçalves F, Heyraud A, de Pinho MN, Rinaudo M (2002) Characterization of White Wine Mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50,6097-6101.
35. Ducasse M-A, Williams P, Canal- Llauberes R-M, Mazerolles G, Cheyrier V, Doco T (2011) Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines. *J Agric Food Chem* 59,6558-6567.

36. Guadalupe Z, Martinez-Pinilla O, Garrido A, Carrillo JD, Ayestaran B (2012) Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chem* 131,367-374.
37. Doco T, Williams P (2013) Purification and Structural Characterization of a Type II Arabinogalactan-Protein from Champagne Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 64,364-369.
38. Wang Y, Xian J, Xi X, Wei X (2013) Multi-fingerprint and quality control analysis of tea polysaccharides. *Carbohydr Polym* 92,583-590.
39. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49,1304-1313.
40. Wisniewski JR, Nagaraj N, Zougman A, Gnad F, Mann M (2010) Brain Phosphoproteome Obtained by a FASP- Based Method Reveals Plasma Membrane Protein Topology. *J Proteome Res* 9,3280-3289.
41. Garnier C, Goerner T, Lartiges BS, Abdelouhab S, de Donato P (2005) Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Res* 39,3044- 3054.
42. Alberts JJ, Takács M, Egeberg PK (2002) Total luminescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC). *Organic Geochemistry* 33,817-828.
43. Peuravuori J, Pihlaja K (2004) Preliminary Study of Lake Dissolved Organic Matter in Light of Nanoscale Supramolecular Assembly. *Environmental Science & Technology* 38,5958-5967.
44. Martin E. Schimpf KC, J. Calvin Giddings (2000) *Field-Flow Fractionation Handbook*.
45. Gigault J, Pettibone JM, Schmitt C, Hackley VA (2014) Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 809,9-24.
46. Sanz R, Puignou L, Reschiglian P, Galceran MT (2001) Gravitational field- flow fractionation for the characterisation of active dry wine yeast. *J Chromatogr A* 919,339-347.
47. Sanz R, Torsello B, Reschiglian P, Puignou L, Galceran MT (2002) Improved performance of gravitational field-flow fractionation for screening wine-making yeast varieties. *J Chromatogr A* 966,135-143.
48. Zattoni A, Melucci D, Reschiglian P, Sanz R, Puignou L, Galceran MT (2004) Characterization of winemaking yeast by cell number-size distribution analysis through flow field-flow fractionation with multi-wavelength turbidimetric detection. *J Chromatogr A* 1054,293- 301.
49. Sanz R, Puignou L, Galceran MT, Reschiglian P, Zattoni A, Melucci D (2004) Coupling gravitational and flow field-flow fractionation, and size- distribution analysis of whole yeast cells. *Anal Bioanal Chem* 379,1068-1075.
50. Gunderson JJ, Giddings JC (1986) Comparison of polymer resolution in thermal field-flow fractionation and size-exclusion chromatography. *Analytica Chimica Acta* 189,1-15.
51. Bolea E, Gorris MP, Bouby M, Laborda F, Castillo JR, Geckeis H (2006) Multielement characterization of metal- humic substances complexation by size exclusion chromatography, asymmetrical flow field-flow fractionation, ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: A comparative approach. *Journal of Chromatography A* 1129,236-246.
52. Cuss CW, Guéguen C (2012) Determination of relative molecular weights of fluorescent components in dissolved organic matter using asymmetrical flow field-flow fractionation and parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta* 733,98- 102.
53. Cuss CW, Guéguen C (2013) Distinguishing dissolved organic matter at its origin: Size and optical properties of leaf-litter leachates. *Chemosphere* 92,1483-1489.
54. Balch J, Guéguen C (2015) Effects of molecular weight on the diffusion coefficient of aquatic dissolved organic matter and humic substances. *Chemosphere* 119,498-503.

55. Stolpe B, Guo L, Shiller AM, Hassellöv M (2010) Size and composition of colloidal organic matter and trace elements in the Mississippi River, Pearl River and the northern Gulf of Mexico, as characterized by flow field-flow fractionation. *Marine Chemistry* 118,119-128.
56. Gigault J, Grassl B, Lespes G (2012) Size characterization of the associations between carbon nanotubes and humic acids in aqueous media by asymmetrical flow field-flow fractionation combined with multi-angle light scattering. *Chemosphere* 86,177-182.
57. Pettibone JM, Gigault J, Hackley VA (2013) Discriminating the States of Matter in Metallic Nanoparticle Transformations: What Are We Missing? *ACS Nano* 7,2491-2499.
58. Yohannes G, Wiedmer SK, Elomaa M, Jussila M, Aseyev V, Riekkola M-L (2010) Thermal aggregation of bovine serum albumin studied by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Analytica Chimica Acta* 675,191-198.
59. Ibrahim T, Daugeron D, Battu S, Moustafa I-A, Lefort C, Cardot P (2015) Dye-free determination of the focalization position for the hollow fiber flow field flow fractionation (HF5) of proteins. *Anal Bioanal Chem* 407,4301- 4304.
60. Vernhet A, Dubascoux S, Cabane B, Fulcrand H, Dubreucq E, Poncet-Legrand C (2011) Characterization of oxidized tannins: comparison of depolymerization methods, asymmetric flow field-flow fractionation and small- angle X-ray scattering. *Anal Bioanal Chem* 401,1563-1573.
61. El Hadri H, Lespes G, Chery P, Potin- Gautier M (2014) Asymmetric flow-field flow fractionation-multidetector coupling for assessing colloidal copper in drain waters from a Bordeaux wine- growing area. *Anal Bioanal Chem* 406,1111-1119.
62. Gaillard M (1976) Etude sur les colloïdes glucidiques et la filtration des vins. Mémoire Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux,.
63. Usseglio-Tomasset L, Castino, M. (1975) I colloidi solubili di natura glucidica dei mosti e dei vini. Parte I. *Riv Viticolt Enol* 28,374-391.
64. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72,248-254.
65. Singleton VL, Zaya J, Trousdale E (1980) White Table Wine Quality and Polyphenol Composition as Affected by Must SO<sub>2</sub> Content and Pomace Contact Time. *American Journal of Enology and Viticulture* 31,14-20.
66. Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre P-L (2013) Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules* 18,1076- 1100.
67. Gilmore AM (2014) How to Collect National Institute of Standards and Technology (NIST) Traceable Fluorescence Excitation and Emission Spectra. In: Engelborghs Y, Visser AJWG (eds) *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 3-27. doi:10.1007/978-1-62703-649-8\_1
68. Coelho C, Aron A, Roullier-Gall C, Gonsior M, Schmitt-Kopplin P, Gougeon RD (2015) Fluorescence Fingerprinting of Bottled White Wines Can Reveal Memories Related to Sulfur Dioxide Treatments of the Must. *Analytical Chemistry* 87,8132-8137.
69. Morzel M, Neyraud E, Brignot H, Ducoroy P, Jeannin A, Lucchi G, Truntzer C, Canlet C, Tremblay-Franco M, Hirtz C, Gaillard S, Peretti N, Feron G (2015) Multi-omics profiling reveals that eating difficulties developed consecutively to artificial nutrition in the neonatal period are associated to specific saliva composition. *Journal of Proteomics* 128,105-112.
70. FEUILLAT M, CHARPENTIER C, BONN EV (1996) Caractérisation des protéines dans les vins blancs - Applications au cépage chardonnay. *Revue des Oenologues* 78,9-14.
71. Van Sluyter SC, Warnock NI, Schmidt S, Anderson P, van Kan JAL, Bacic A, Waters EJ (2013) Aspartic Acid Protease from *Botrytis cinerea* Removes Haze- Forming Proteins during White Winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61,9705-9711.
72. Guilloux-Benatier M, Guerreau J, Feuillat M (1995) Influence of Initial Colloid Content on Yeast Macromolecule Production and on the Metabolism of Wine Microorganisms. *American Journal of Enology and Viticulture* 46,486-492.

73. Robbins RJ (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51,2866-2887.
74. Doco T, Brillouet JM (1993) Isolation and characterization of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydr Res* 243,333-343.
75. Van Sluyter SC, Marangon M, Stranks SD, Neilson KA, Hayasaka Y, Haynes PA, Menz RI, Waters EJ (2009) Two-Step Purification of Pathogenesis-Related Proteins from Grape Juice and Crystallization of Thaumatin-like Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57,11376-11382.
76. Le Bourse D, Conreux A, Villaume S, Lameiras P, Nuzillard JM, Jeandet P (2011) Quantification of chitinase and thaumatin-like proteins in grape juices and wines. *Anal Bioanal Chem* 401,1541-1549.
77. Charpentier C, Dos Santos AM, Feuillat M (2004) Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during aging of French flor sherry wine "Vin jaune". *Int J Food Microbiol* 96,253-262.
78. Coble PG (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar Chem* 51,325-346.
79. Sefton MA, Francis IL, Williams PJ (1993) The Volatile Composition of Chardonnay Juices: A Study by Flavor Precursor Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 44,359-370.
80. Jaeckels N, Tenzer S, Rosch A, Scholten G, Decker H, Fronk P (2015)  $\beta$ - Glucosidase removal due to bentonite fining during wine making. *Eur Food Res*





**EXAMINING MOLECULAR SIZE OF AQUATIC DISSOLVED ORGANIC MATTER  
ALONG A SALINITY GRADIENT USING ASYMMETRICAL FLOW FIELD-FLOW  
FRACTIONATION AND EEM FLUORESCENCE**

To be submitted to *Environmental Science and Pollution Research*

J. Parot<sup>a,b,c</sup>, C. Guéguen<sup>c,\*</sup>, E. Parlanti<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> *Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, LPTC, F-33400 Talence, France.*

<sup>b</sup> *CNRS, UMR 5805, EPOC, LPTC, F-33400 Talence, France*

<sup>c</sup> *Chemistry Department, Trent University, 1600 West Bank Drive, Peterborough, K9J 7B8 ON,  
Canada,*

*\*Corresponding author: Parlanti: Tel: + 33 5 40 00 84 91; Fax: + 33 5 40 00 22 67; email: [edith.parlanti@u-bordeaux.fr](mailto:edith.parlanti@u-bordeaux.fr) – Guéguen: Tel: +1 (705) 748 1011; Fax: +1 (705) 748 1625; email: [celinegueguen@trentu.ca](mailto:celinegueguen@trentu.ca)*

## **Highlights**

DOM dynamics in estuary was characterized using asymmetric flow field-flow fractionation and EEM fluorescence.

Distinct changes in DOM character with estuary position were observed

Transport and in situ production were two major sources of DOM in the estuary

## **Abstract**

Aquatic dissolved organic matter (DOM) is a mixture of ill-defined macromolecules. New approaches are required for a better understanding of its reactivity and mobility in natural waters. In this study, asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) was used for the first time to determine the molecular size and chemical composition of DOM collected in the Gironde estuary (France). Mean DOM molecular size (MW) decreased from 1524 to 1057 Da with increasing salinity. A significant reduction in MW was also noticed at intermediate salinity (4-6 and 8-10), suggesting colloidal removal during estuarine mixing and/or flocculation. Low-salinity DOM samples (< 5) were enriched in high MW molecules with a more aromatic character relative to the high salinity DOM samples. EEM fluorescence and fluorescence indices such as humification index (HIX) and biological index (BIX) application confirmed the estuary division in upper and lower part with respectively higher size, HIX and lower size, BIX with typical fluorescence DOM. Furthermore, DOM molecular weight of three oceanic waters from the French Atlantic coast (oceanic end-member of the Gironde estuary, Arcachon Bay and Biarritz) were compared and depending on their sources and watersheds.

## **Keywords**

Gironde estuary; Asymmetric flow field-flow fractionation (AF4); Dissolved organic matter; Excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy; Molecular weight (MW), Salinity

## I. Introduction

The continental fluxes of nutrients and organic matter have important impacts on marine ecosystems. The chemical identity and size of dissolved organic matter (DOM) can be the key to the most urgent questions regarding the cycling of DOM in the ocean (Findlay and Sinsabaugh, 2003; Shimotori et al., 2009). DOM in aquatic environments has been studied for its importance in a variety of physical, geochemical, and biological processes (Cai et al., 1999; Del Castillo and Coble, 2000; Scully and Lean, 1994; Takács et al., 1999) in the global carbon cycling. Although the estuarine and coastal waters have been recognized as significant sources of DOM, the estuarine transformation is not yet understood. For example, it is still unclear how estuarine mixing influences DOM composition, nature and size (Ishii and Boyer, 2012; Kattner et al., 1999; Miller, 1999).

Terrestrially derived DOM is a major source of DOM to the river and near-shore areas (Coble et al., 1998). These terrestrial inputs can represent between 20% and 70% of the DOM pool in coastal zones (Del Castillo et al., 1999) depending on the river inputs. However, allochthonous DOM sources from terrestrial inputs have also been shown to be important contributors to estuarine through the river discharges and in coastal environments by the exchanges with the open ocean and can explained 30% of the primary production (Boyd and Osburn, 2004; Del Castillo and Coble, 2000; Dittmar et al., 2001; Hernes et al., 2001; Lalli and Parsons, 1997; Moran et al., 1991a; Mueller and Ayukai, 1998; Yamashita et al., 2008).

Moreover, the large DOM dynamics in coastal zones because of terrestrial DOM inputs, autochthonous DOM production and the DOM evolution have to be studied to better understand their relative contributions in this dynamics (Yamashita et al., 2008). Drastic changes in ionic strength and pH can irreversibly influence DOM composition and concentration (Yan et al., 2013). For example, flocculation plays a large role on the precipitation/sedimentation of the organic matter increasing suspended particulate matter (SPM) concentration (Asmala et al., 2014). Flocculation is also the dominant process for extraction of dissolved elements during estuary mixing and the salt-induced flocculation is typically enhanced at salinity <15-20 (Sholkovitz, 1978, 1976; Sholkovitz et al., 1978; Sholkovitz and Copland, 1981).

Flocculation is largely associated with the estuarine turbidity maximum (ETM) (Eisma, 1986; Uncles et al., 2006), where significant proportions of riverine organic and inorganic matter are removed before entering in coastal waters (Lisitsyn, 1995). Understanding dynamics and the transport of terrestrial-derived DOM in the continuum between the terrestrial system and the benthic environment in estuarine and coastal waters is thus of fundamental importance.

The majority of DOM released by phytoplankton in the oceans consists of low molecular weight organic molecules (~30–50% of dissolved organic carbon (DOC); Guo et al., 2007). In contrast, terrestrial DOM in river is dominated by colloidal macromolecules (up to 86% of DOC; Guéguen et al., 2002). Size distributions of DOM can be determined experimentally by ultrafiltration (Guéguen et al., 2002; Guo et al., 2007; Mopper et al., 1996), however only discrete colloidal fractions of materials (typically >1-10 kDa) can be isolated. Size exclusion chromatography (SEC) can provide information on molecular weight distribution and polarity of aquatic DOM (Dittmar and Kattner, 2003) but the percentage of isolated or fractionated DOM can be low (typically < 60-70 % with river samples). High performance size exclusion chromatography (HPSEC) requires the use of organic solvents which can induced some alterations of DOM (Chin et al., 1994; Nebbioso and Piccolo, 2013; Thurman and Malcolm, 1981; Yan et al., 2012). Recently, asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4), a chromatography-like separation technique, was developed for DOM continuous size distribution (from 0.001 to > 10  $\mu\text{m}$ ) (Batchelli et al., 2009; Guéguen and Cuss, 2011; Hasselöv et al., 2007; Pifer et al., 2011; Zanardi-Lamardo et al., 2004). AF4 has been applied to terrestrial humic and fulvic acids (Beckett et al., 1987; Guéguen and Cuss, 2011) and more recently to marine samples (Balch and Guéguen, 2015; Clark et al., 2002; Hasselöv, 2005; Stolpe et al., 2014, 2010; Wells, 2002). The major advantage of AF4 is to determine the continuous size distribution of macromolecules at natural concentration without altering the original pH and ionic strength of the samples because a step of extraction and concentration with solvents is not required (Schimpf et al., 2000). The analysis parameters are strongly dependent on the sample origin (e.g., seawater, river water, soil solution), as the physicochemical conditions, including ionic strength, turbidity, pH, and concentration of organic matter, can be completely different.

In this study, we examined the influence of salinity and terrestrial inputs on the size distribution of DOM in the Gironde estuary, Arcachon Bay and the nearshore zone of the Bay of Biscay using AF4 coupled to an online UV/Visible diode array detector (DAD). Specifically, the objectives were to (1) determine DOM MW in the Gironde estuary; (2) assess the influence of flocculation on DOM MW distribution and optical properties; and (3) to assess the influence of river inputs on coastal DOM in three sites on the French Atlantic coast.

## II. Methods

### 1. Sampling sites and collection

Subsurface water samples (1 m depth; Table 1) were collected from the Gironde Estuary in September 2014 during the HALOGIR cruise on board the RV Côtes de la Manche, the Arcachon Bay and in the Bay of Biscay off Biarritz on the French Atlantic coast (Figure 1(1)).

*Table 1: Characteristics of water samples collected in Gironde Estuary (G), Arcachon Bay (A) and Biarritz area (B)*

<b>Samples</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>	<b>G7</b>	<b>G8</b>
SPM (mg.L <sup>-1</sup> )	115	305	139	589	233	292	69	48
Salinity	2.30	2.90	3.30	3.50	4.90	6.90	7.90	8.20
<b>Samples</b>	<b>G9</b>	<b>G10</b>	<b>G11</b>	<b>G12</b>	<b>G13</b>	<b>G14</b>	<b>G15</b>	
SPM (mg.L <sup>-1</sup> )	488	60	24	25	15	14	32	
Salinity	9.80	12.00	17.50	24.10	32.70	32.40	32.60	
<b>Samples</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	
Salinity	34.21	28.6	35	31.3	30	30.8	34.4	

The Gironde Estuary (average discharge 640 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>; southwestern France; Figure 1(1)), Western Europe's widest estuary, is one of the most turbid estuaries in Europe (Huguet et al., 2009; Jalón-Rojas et al., 2015). The Garonne and Dordogne Rivers compose the Gironde estuary and contribute respectively 65 and 35% of the freshwater inputs. In surface waters of the middle Gironde estuary, suspended particulate matter (SPM) concentrations range between 0.1 and 10 g.L<sup>-1</sup> (Deborde et al., 2007; Sottolichio and Castaing, 1999), which is 10 to 24 times greater than that found in comparable European rivers (Mundaka, Westerschelde and Ems Rivers; Burdloff et al., 2002; Sautour and Castel, 1995). Arcachon Bay is a meso-tidal lagoon (south-west France) and empties into the Atlantic Ocean through two narrow entrances. The area of the lagoon is approximately 180 km<sup>2</sup> during high tide and only 40 km<sup>2</sup> at low tide. The bay is composed by one third of sandy channels and two third of intertidal mud flats (Dubois, 2012). The lagoon salinity ranged from 22 to 35 g.L<sup>-1</sup> (Martin et al., 2010) depending on the river inflow and the tide. Two main rivers (i.e. Leyre and Porges Rivers) contribute more than 95% of the total annual freshwater inflow (Deborde et al., 2007; Rimmelin et al., 1998). Surface waters were also collected off Biarritz in the South Biscay Bay (approximately 2 km off the coast). The Bay of Biscay is a gulf with an area of 223,000km<sup>2</sup>, mainly influenced by the Adour River (catchment area

16,880km<sup>2</sup>). All the samples were filtered through precombusted glass fibre filters (Whatman GF/F, 0.7 μm) immediately after sampling. Water samples were stored in the dark at 4°C until analyzes.

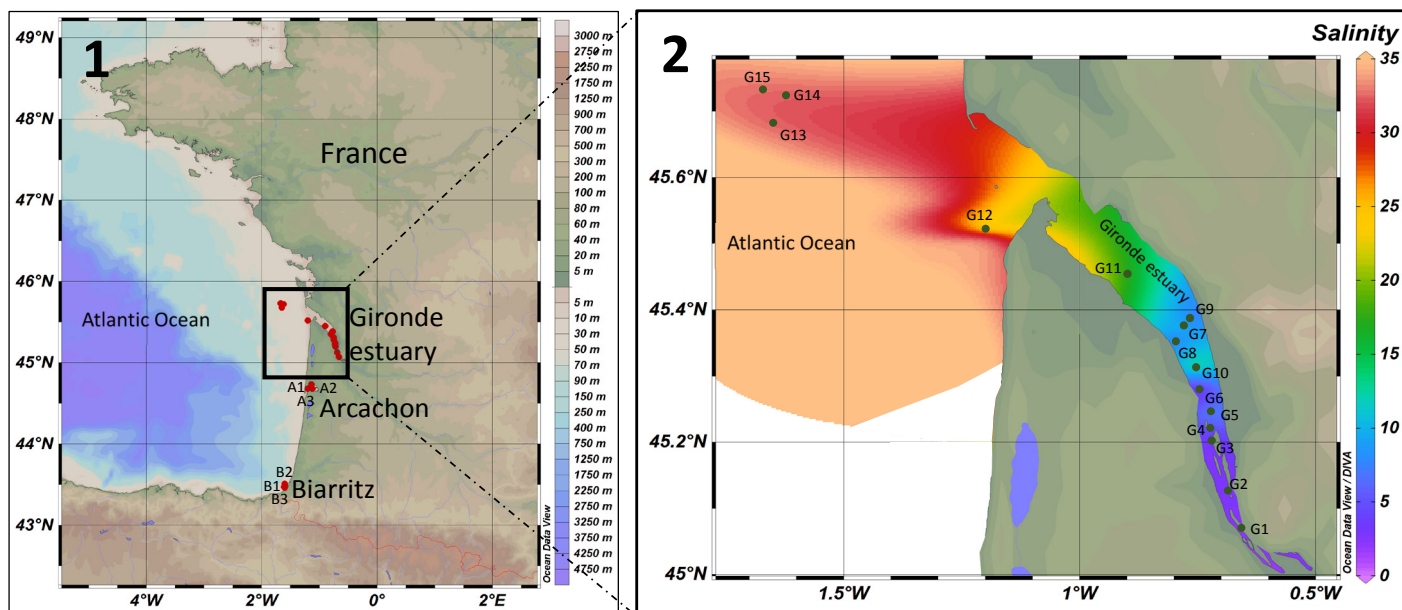


Figure 1: (1) Location of sampling sites in Gironde Estuary (G), Arcachon Bay and Biarritz area (B) (2); samples in Gironde estuary and the representation of the salinity evolution for each sampling sites

## 2. Dissolved organic carbon measurements (DOC) and suspended particle matter (SPM)

DOC measurements were obtained with a Shimadzu Total Organic Carbon analyzer (TOC-V CSN). The instrument was run in non-purgeable organic carbon (NPOC) mode. The CO<sub>2</sub> formed was measured using non-dispersive infrared detection. For each sample, the result was the mean of three or four satisfactory injections in terms of standard deviation (< 0.1) and variation coefficient (< 2%).

The determination of SPM concentration was performed by filtration through precombusted glass fibre filters (Whatman GF/F, 0.7 μm). The filters were dried to constant weight (45°C).

## 3. AF4-DAD

AF4 fractionation was an AF2000 Focus fractionation system (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) with two PN1130 HPLC pumps to control the focus and axial flows, a PN1160 syringe pump to control the crossflow rate, and a PN1175 degasser to remove gas from the mobile phase prior to introduction the pumps. The membrane in the separation channel was a 300 Da polyethersulfone (PES, Postnova Analytics, Landsberg, Germany) and the spacer was a 500 μm. Flows for the separation sequence were set to 0.4, 3.0, 2.2 mL/min axial, focus and cross flows, respectively, during the focus part, and then this cross flow was maintained during the elution (20 min). An optimization of flow rates to have a good compromise between peak resolution with the calibration standards and a good separation time

was lead. For each sample approximately 1mL was injected into the Rheodyne valve with a 0.3mL sample loop to condition the loop and to minimize the memory effect of the sample in the loop.

Fractograms were acquired at a wavelength of 254 nm using a diode array detector Shimadzu SPD-M20A (DAD) coupled to the AF4 (Guéguen and Cuss, 2011). The DAD was set to scan a wavelength range of 200–700 nm every 0.64 s, with wavelength increments of 1.2 nm. To ensure the absence of memory effects, a blank sample of carrier fluid was run before each sample analysis, calibration or standards. At the beginning and end of each analysis day, a calibration was conducted by an injection of standards - a macromolecule mixture with molecular weight spanning a range of 0.48 – 14.3kDa (Balch and Guéguen, 2015; Cuss and Guéguen, 2014, 2012). For each calibration curve, the  $R^2$  value was determined and the mean in this study was  $0.98 \pm 0.01$  ( $n = 22$ ).

The pH (7.5-8.5) and ionic strength ( $0.2 - 55 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  equal to salinity 2 - 34) of the carrier phase was adjusted with NaOH (Sigma Aldrich) and NaCl (Cadelon Laboratories) to match that of the sample in order to minimize the influence of the carrier phase on the size and composition of DOM measured by AF4. For each sample, macromolecule standards were prepared in a carrier phase matching the pH and ionic strength of the sample to be analyzed (Table III 1). For the same retention time (e.g. 10 min), the apparent molecular weights (AMW), defined by standard-based calibration curves (example of five calibration curves in Supplementary information 1), increased from 1059 Da to 1292 Da to 1555 Da when the mobile phase salinity increased from 1.55 to 8.7 to 36.4. The importance of this procedure is confirmed by the fact that the AMW for the same retention time increase more than 30 % between AF4 fresh water conditions and AF4 marine water conditions.

The molecular weight distributions (MWD) were determined based on the average calibration curve measured on the same day (Guéguen and Cuss, 2011). The AMW of each sample was estimated by applying both calibration curves and a standard deviation was calculated for each sample. The standard deviation on AMW was better than 2.5%.

Absorption coefficients  $a(\lambda)$  ( $\text{m}^{-1}$ ) at each wavelength were calculated with:

$$a(\lambda) = 2.303A(\lambda)/l$$

where  $a(\lambda)$  is the absorbance at wavelength ( $\lambda$ ) and  $l$  is the optical path length in meters.

#### **4. Fluorescence analysis**

Fluorescence spectra were recorded with a Fluorolog FL3-22 Horiba Jobin Yvon Fluorometer. Excitation/emission matrix spectra (EEMs) involved scanning and recording of 17 individual emission spectra (wavelengths of 260–700 nm) with over excitation wavelengths of 250–410 nm at sequential



10 nm increments through successive emission scans. EEM spectra were obtained by subtracting ultrapure water (MilliQ, Millipore) blank spectra, recorded under the same conditions. To generate 3D contour plots of fluorescence intensity (Raman unit) as a function of excitation and emission wavelengths the 17 scans were used. SigmaPlot (for Windows version 10.0, Systat Software, Inc) was used to plot the EEMs (Figure 2). Humification index (HIX), measured at  $\lambda_{exc}$  250 nm, is related to the aromaticity of DOM (Zsolnay et al., 1999) and BIX, measured at  $\lambda_{exc}$  310 nm, is the biological index linked to recent autochthonous DOM production (Huguet et al., 2009). High HIX values (between 10 and 16) are the sign of strongly humified organic material, mainly of terrestrial origin, whereas low values (<4) are associated with autochthonous DOM. The emission spectrum for excitation at 310 nm is influenced by the presence of both terrestrial and microbial originating components, and values of BIX below 0.6 are considered to contain little autochthonous DOM whereas values greater than 0.8 - 1.0 correspond to freshly produced DOM of biological or microbial origin (Huguet et al., 2009).

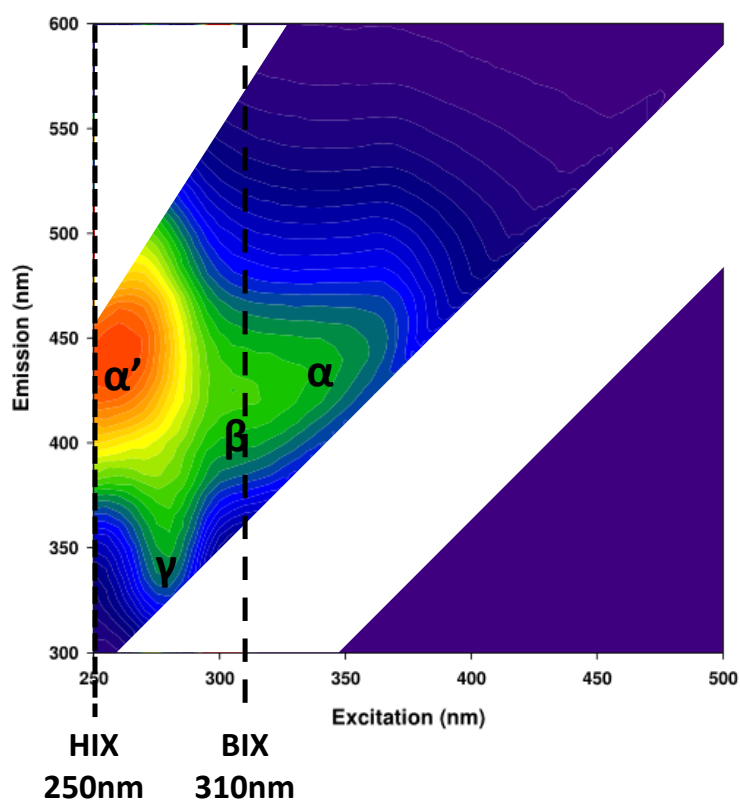


Figure 2: EEM with the major fluorescence bands for water ( $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and excitation wavelengths for which two indices were calculated: HIX (short dash) and BIX (large dash)

## II. Results and discussion

### 1. Apparent molecular weight in the Gironde estuary

Fractograms of DOM material measured at absorbance 254 nm for respectively low (G1 sample; 2.3), intermediate (G11 sample; 17.5) and high salinities (G13 sample; 32.7) displayed a wide peak with retention times (rt) between 9-12 min. (Figure 3). The apparent molecular weight (AMW) decreased from 1403 Da for the sample G1 in the rivers to 1080 Da in the coastal zone for the sample G13 (Figure 4 A). This rapid size reduction can be due to intramolecular contraction or coiling induced by the increase of ionic strength and the concentration of divalent and monovalent ions in the coastal zone (Engebretson and von Wandruszka, 1994), which leads to lower retention times and so lower MW values. Comparable AMW ranges were reported in freshwater DOM using AF4 (Balch and Guéguen, 2015; Guéguen and Cuss, 2011; Stolpe et al., 2010) and HPSEC (Pelekani et al., 1999; Romera-castillo et al., 2014). The large MW at low salinity reflected the larger contribution of high AMW (Cuss and Guéguen, 2014; Guéguen et al., 2011) terrestrial humic material which is typically associated with high MW. On the other hand, lower AMW DOM (1000 to 1100Da) at high salinity (> 32) was largely influenced by biological activity and reflected the dominance of autochthonous DOM (Del Castillo and Coble, 2000; Dittmar et al., 2001; Hernes et al., 2001; Moran et al., 1991b; Mueller and Ayukai, 1998).

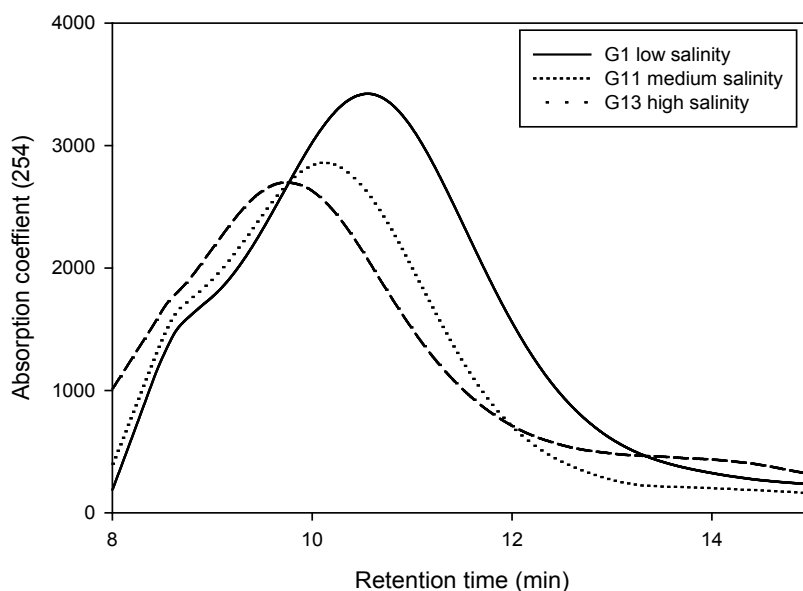


Figure 3: Fractograms of the Absorbance (254nm) after the separation by asymmetrical flow field-flow fractionation, variation in function of the retention time for three samples from the Gironde estuary: G1 low salinity (large dash), G11 mean salinity (dot line) and G13 high salinity (line).

At salinity 4-6 and 8-10, AMW decreased quickly from 1450 to 1298 Da and from 1450 to 1211 Da (Figure 4 B). This drop in AMW coincided with a rapid increased in SPM (Table 1), highlighting flocculation processes. Sholkovitz (1976) showed that the DOM removal was enhanced at low salinity

(0-5) in mixing experiments. Previous studies (Asmala et al., 2014; Lisitsyn, 1995) showed that salt-induced flocculation of riverine DOM was enhanced at salinity 2 and 6. Together these results suggest that the significant decrease in MW in the Gironde estuary at salinity 4-6 and 8-10 was due to salt-induced flocculation.

After removing the salt-induced flocculation impacted DOM AMW (Figure 4 C), two clusters with homogeneous AMW can be found: the upper estuary (salinity < 22) with AMW of  $1442 \pm 37$  Da and a lower estuary (salinity > 22) with AMW of  $1104 \pm 38$  Da.

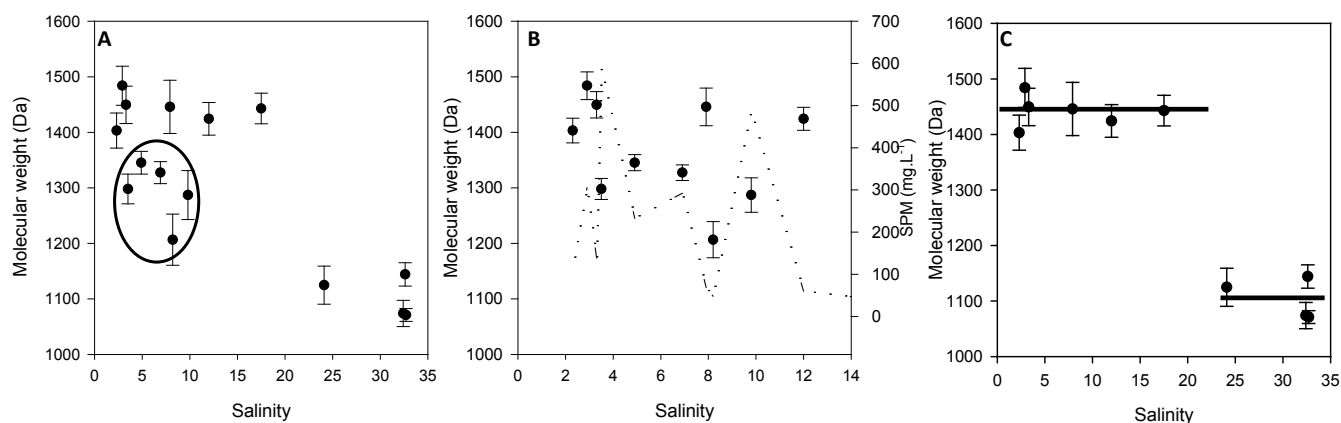


Figure 4: (A) Molecular weight evolution in function of the salinity gradient, (B) Molecular weight evolution between 0 and 12 salinity and (C) molecular weight evolution in function of the salinity gradient without the point where flocculation was suspected, –mean between 22-35 in salinity

The EEMs (Figure 5) at 4 different salinities showed an evolution in the DOM type along the estuary in relation with salinity, primary production influence and leads to investigate this change, from humic-like to protein-like DOM along a salinity increase as Fellman had explained before (Fellman et al., 2011). Also they reported three different DOM sources: allochthonous riverine DOM with a major part of terrestrial humic-like (peaks  $\alpha$  and  $\alpha'$ ), recently produced autochthonous and protein-like DOM (peaks  $\alpha'$ ,  $\gamma$  and  $\beta$ ) and autochthonous DOM from estuarine zone composed by autochthonous and protein-like DOM (peak  $\gamma$  and  $\beta$ ). A lot of parameters (nutrients gradients, hydrology variation, soil and vegetation characteristics...) can controlled DOM quality and also the DOM modification in an estuary due to the autochthonous production.

At low salinity (2.3 and 7.9), DOM were dominated by humic-like fluorescence ( $\alpha'$  and  $\alpha$ ) with 70% of total fluorescence (Supplementary information 1) whereas protein fluorescence ( $\gamma$ ) accounted for < 7% of total fluorescence. This kind of DOM fluorescence can be typically terrestrial DOM. Upland in the Gironde estuary at salinity 17.5, fluorescence analysis showed an evolution in DOM type with humic-like fluorescence around 65% of the fluorescence and autochthonous protein-like fluorescence around 10% of the fluorescence (Figure 5). With a nearby signature in terms of autochthonous protein-

like fluorescence which can represent a non-negligible part in seawater or estuarine environment for example at P5: 275nm/310nm (Murphy et al., 2008), C8: 275nm/304nm (Stedmon and Markager, 2005) and C7: 270nm/299nm (Yamashita et al., 2008).

At salinity 24.1, protein-like fluorescence was not significantly higher than before, around 12% of the fluorescence and also dominated by humic-like fluorescence close to 51% of the fluorescence (Supplementary information 1). The coastal marine water sample than estuary (salinity 32.7) was significantly different than the others because protein-like fluorescence (like label  $\gamma$  or peak B) represented more than 30% of the total fluorescence and humic-like fluorescence was close to 40% (Figure 5; Supplementary information 1). This fluorescence signature is typical from coastal area because of the autochthonous production and the dilution of terrestrial inputs from the river/estuary.

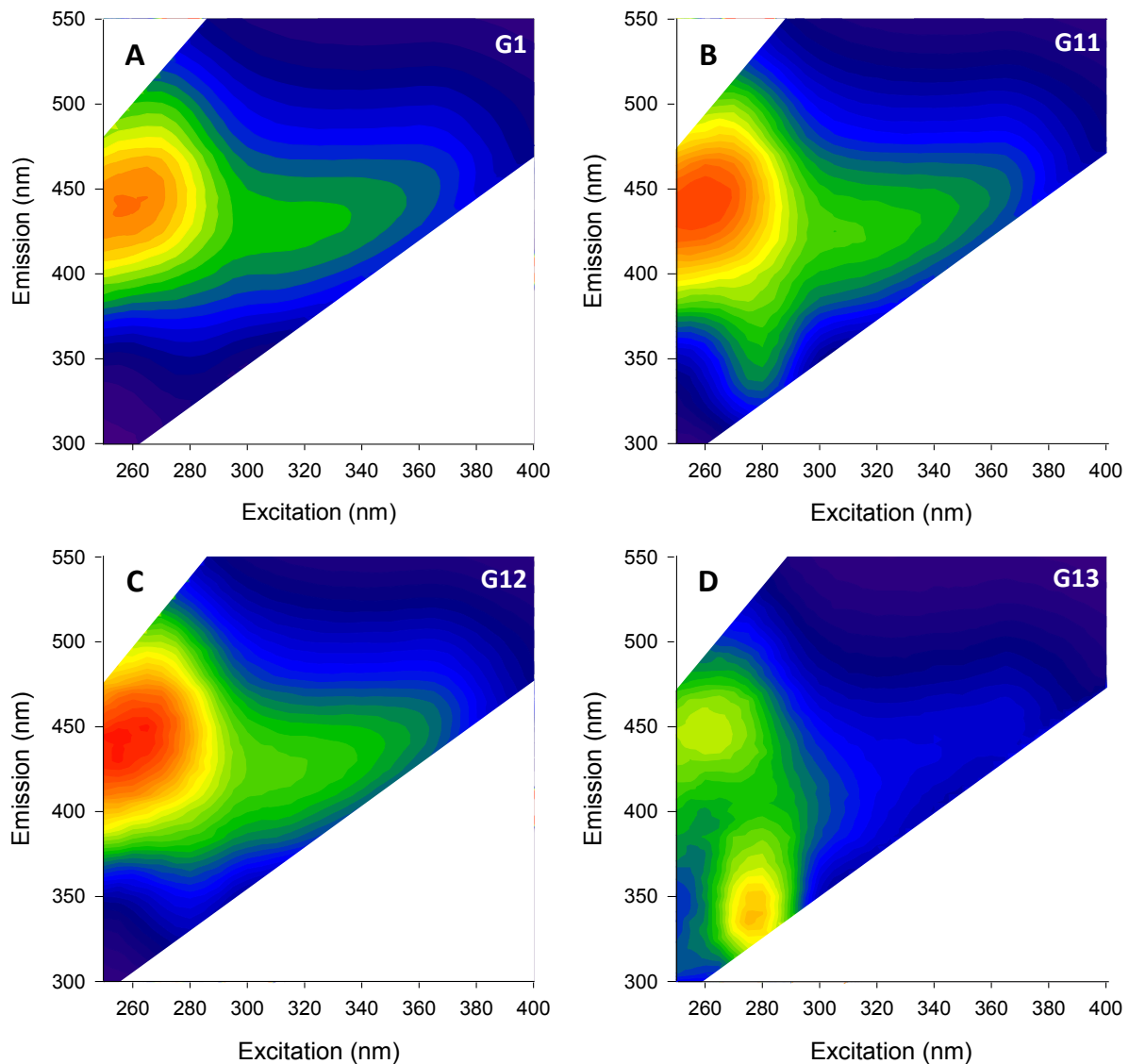


Figure 5: EEMs along the Gironde estuary at salinity (A) 2.3, (B) 17.5 (C) 24.1 and (D) 32.7.

The humification index, linked to the DOM aromaticity (Zsolnay et al., 1999), ranged from 15 to 2.3 (Figure 6). The HIX remained relatively constant (between 15 and 13.9) at salinity < 8 before decreasing steadily to 2.3 at salinity 32.6. The HIX decrease with increasing salinity was observed in previous work (Huguet et al., 2009) which seems to show the greater presence of humified compounds in this upper part of the estuary. So, the part of the estuary with salinities between 2.3 and 20 can be characterized by highly humified organic material. Along the Gironde estuary, BIX, characteristic of autochthonous biological activity in water samples, increased from 0.65 to 0.95 with increasing salinity (Figure 6). Low BIX values (0.65-0.74) were found at salinity < 20, consistent with Huguet et al. (2009). Together HIX and BIX in accordance with previous studies in the Gironde estuary (Huguet et al., 2009), confirmed that the upper estuary was characterized by a lower biological productivity compared to the downstream estuary ( $S > 20$ ) where BIX, and thus primary production, was significantly higher.

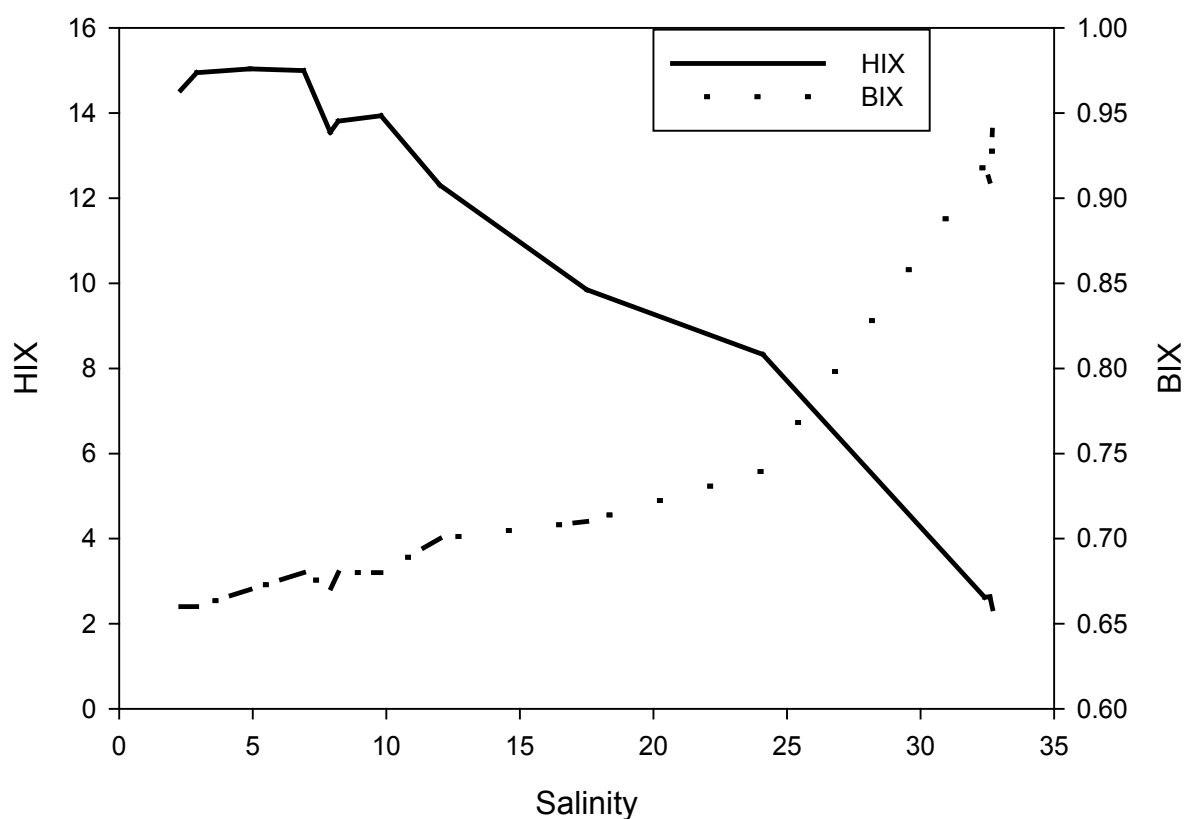


Figure 6 : Humification index (HIX) and index of autochthonous production (BIX) along the salinity gradient of the Gironde estuary

## 2. AMW in the marine domain

Three oceanic waters on the French Atlantic coast along a 200 km north-south gradient (Gironde, Arcachon Bay and Biarritz; Figure 1) were studied to compare their AMW for the same range of salinity during the summer 2014. This sites presented different characteristics in terms of type and quantity of terrestrial inputs and watersheds.

The AMW of DOM, for Arcachon (n=3), Gironde (n=3) and Biarritz (n=3) was  $833 \pm 79$ ,  $1096 \pm 40$  Da and  $1080 \pm 47$  Da, respectively (Figure 7). The DOM MW from the Gironde and Biarritz were significantly higher than in Arcachon Bay (Figure 7;  $p < 0.001$ ) whereas Biarritz and Gironde did not have significant difference in DOM MW.

The DOM from three oceanic sites did not present the distribution in MW for the same range of salinity. The terrestrial and estuarine inputs seems to be the main drivers in coastal environments for the DOM MW as previous studies advanced (Dittmar et al., 2007). The oceanic end-member of the Gironde estuary and Biarritz were influenced by the ocean-river mixing with terrestrial inputs from two rivers (Garonne River and Adour River) characterized by high river discharge and agricultural watersheds. Arcachon Bay was fed by several of sandy streams (Deborde et al., 2007; Rimmelin et al., 1998) characterized by a forestry watershed. The bay was composed in the intertidal zone for the first third by sandy channels and the two third by intertidal mud flats and receives important seawater exchanges, estimated around  $384 \times 10^6 \text{ m}^3$  for each tidal cycle (Plus et al., 2006).

Depending on the influence and inputs in coastal and marine area, DOM AMW can be different. Comparing with marine sites around the world with salinities close to 35, molecular weights were more in accordance with Arcachon than Gironde or Biarritz (Dittmar et al., 2007).

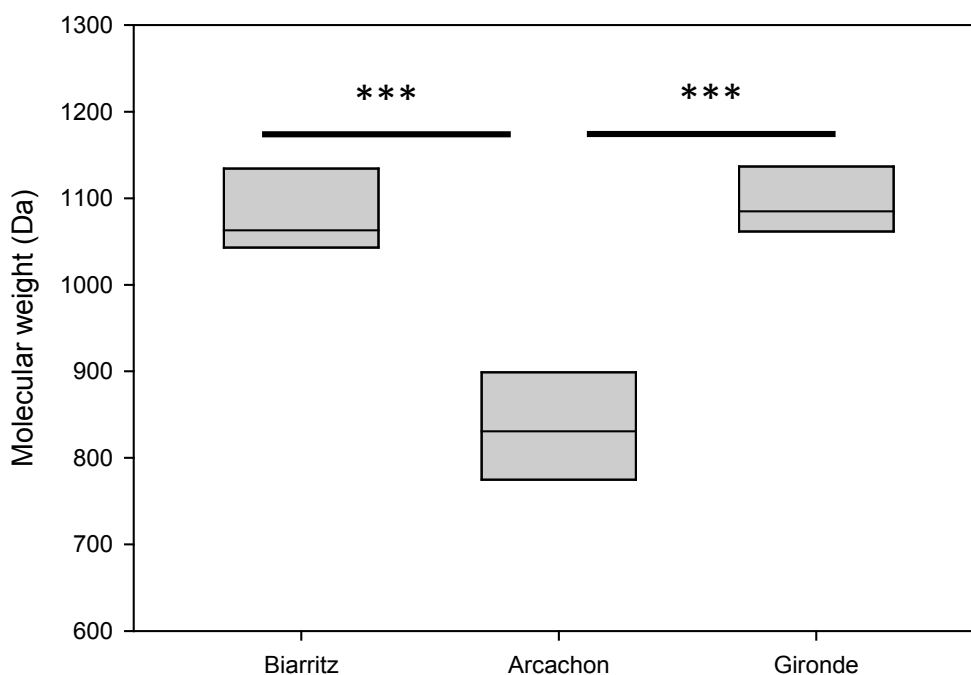


Figure 7: Molecular distribution for samples from the oceanic end-member of the Gironde estuary, Arcachon Bay and Biarritz (Atlantic Ocean) (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

### **III. Conclusion**

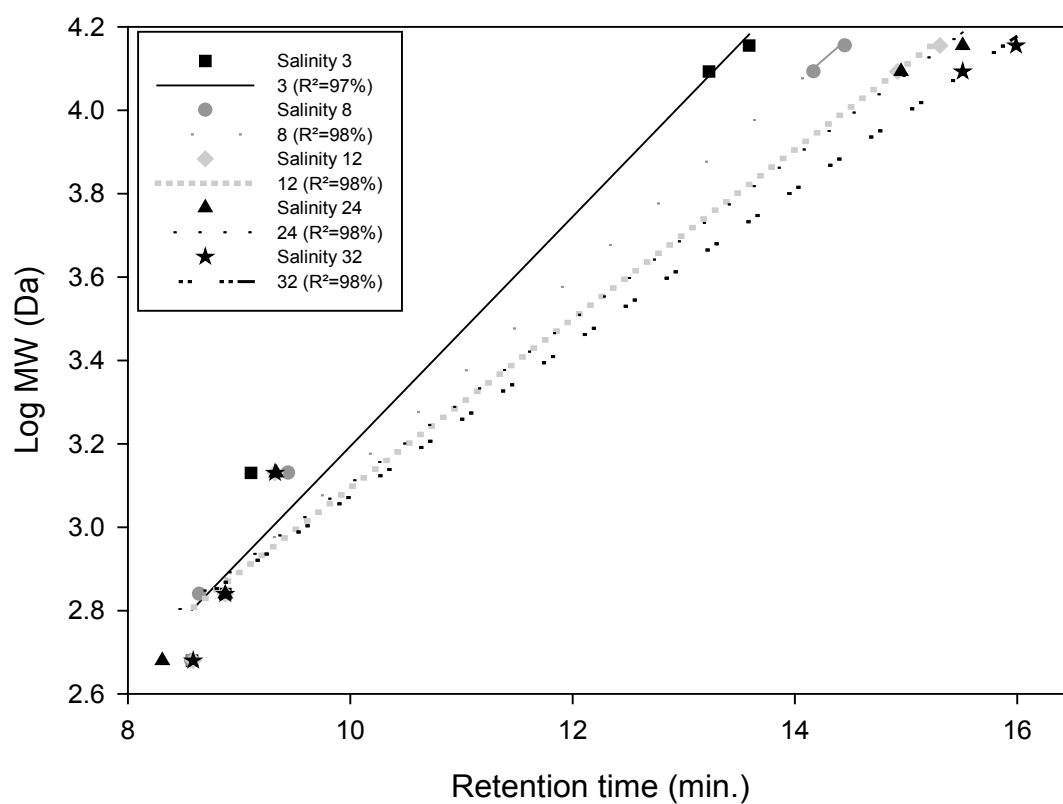
The DOM molecular weight determination and the influence of salinity are crucial to understand pollutant distribution and fate in natural environments. Asymmetrical flow field-flow fractionation technique coupled to a UV-Visible spectrophotometer was used to assess size distributions of aquatic DOM samples, with salinities between 2 and 33, without any extraction steps and using an eluent with the same physico-chemical properties (pH and conductivity). The application of EEM spectroscopy and fluorescence indices such as HIX and BIX is complementary tools, really adapted to the study of DOM dynamics and transport in estuarine systems.

The Gironde estuary can be separated in two parts, the upper estuary characterized by higher molecular weights, HIX and the lower BIX and lower estuary, coastal area with lower molecular weights and HIX and higher BIX. In terms of size, two significant regions at 1441Da and 1104Da were defined. Throughout this study, it has been demonstrated that DOM evolved in size and composition along the ocean-river mixing and many processes seems to have influences in these changes. Between different oceanic waters, DOM can be significantly different in function of their sources and environmental conditions.

### **Acknowledgments**

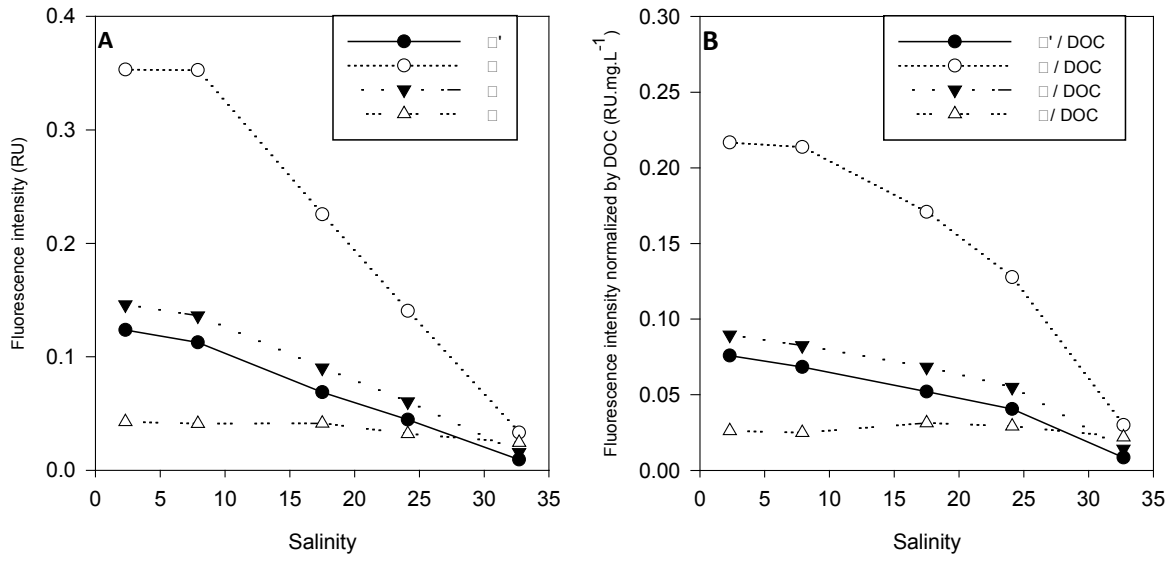
This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). The authors acknowledge financial support by the Canada Research Chair Program (CG) and National Sciences and Engineering Research Council of Canada (CG). Special acknowledgments for Pierre Labadie, Mathilde Lauzent and Gabriel Munoz for the sampling in the Gironde estuary and Clara Micheau for DOC analyzes.

Supplementary information



Supplementary information 1: Calibration curves of five salinities of mobile phase: 3, 8, 12, 24 and 32 with 5 standards. ( $R^2$  = coefficient of determination of the linear regression for each calibration curve). Macromolecule-specific wavelength maxima were extracted from the on-line diode array detector as follows Rhodamin B (550nm; 479Da), Bromophenol blue (591nm; 692Da), Vitamin B12 (355nm; 1350Da), Cytochrome C (450nm; 12400Da), lysozyme (270nm; 14300Da)





Supplementary information 2: Evolution of fluorescence labels ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and fluorescence labels ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) normalized by the DOC concentration along the salinity gradient in the Gironde estuary

- Asmala, E., Bowers, D.G., Autio, R., Kaartokallio, H., Thomas, D.N., 2014. Qualitative changes of riverine dissolved organic matter at low salinities due to flocculation. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 119, 2014JG002722. doi:10.1002/2014JG002722
- Balch, J., Guéguen, C., 2015. Effects of molecular weight on the diffusion coefficient of aquatic dissolved organic matter and humic substances. *Chemosphere* 119, 498–503. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.013
- Batchelli, S., Muller, F.L.L., Baalousha, M., Lead, J.R., 2009. Size fractionation and optical properties of colloids in an organic-rich estuary (Thurso, UK). *Mar. Chem.* 113, 227–237. doi:10.1016/j.marchem.2009.02.006
- Beckett, R., Jue, Z., Giddings, J.C., 1987. Determination of Molecular Weight Distributions of Fulvic and Humic Acids Using Flow Field-Flow Fractionation. *Environ. Sci. Technol* 21, 289–295.
- Boyd, T.J., Osburn, C.L., 2004. Changes in CDOM fluorescence from allochthonous and autochthonous sources during tidal mixing and bacterial degradation in two coastal estuaries. *Mar. Chem.* 89, 189–210.
- Burdloff, D., Gasparini, S., Villate, F., Uriarte, I., Cotano, U., Sautour, B., Etcheber, H., 2002. Egg production of the copepod *Acartia bifilosa* in two contrasting European estuaries in relation to seston composition. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 274, 1–17.
- Cai, Y., Jaffe, R., Jones, R.D., 1999. Interactions between dissolved organic carbon and mercury species in surface waters of the Florida Everglades. *Appl. Geochemistry* 14, 395–407.
- Chin, Y.-P., Aiken, G., O’Loughlin, E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1853–1858.
- Clark, C.D., Jimenez-Morais, J., Jones, I.I.G., Zanardi-Lamardo, E., Moore, C.A., Zika, R.G., 2002. A time-resolved fluorescence study of dissolved organic matter in a riverine to marine transition zone. *Mar. Chem.* 78, 121–135.
- Coble, P.G., Del Castillo, C.E., Avril, B., 1998. Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 45, 2195–2223.
- Cuss, C.W.W., Guéguen, C., 2014. Relationships between molecular weight and fluorescence properties for size-fractionated dissolved organic matter from fresh and aged sources. *Water Res.* 68, 487–497. doi:10.1016/j.watres.2014.10.013
- Cuss, C.W.W., Guéguen, C., 2012. Determination of relative molecular weights of fluorescent components in dissolved organic matter using asymmetrical flow field-flow fractionation and parallel factor analysis. *Anal. Chim. Acta* 733, 98–102. doi:10.1016/j.aca.2012.05.003
- Deborde, J., Anschutz, P., Chaillou, G., Etcheber, H., Commarieu, M.-V., Lecroart, P., Abril, G., 2007. The dynamics of phosphorus in turbid estuarine systems: Example of the Gironde estuary (France). *Limnol. Oceanogr.* 52, 862–872. doi:10.4319/lo.2007.52.2.0862
- Del Castillo, C.E., Coble, P.G., 2000. Seasonal variability of the colored dissolved organic matter during the 1994-95 NE and SW Monsoons in the Arabian Sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 47, 1563–1579.
- Del Castillo, C.E., Coble, P.G., Morell, J.M., Lopez, J.M., Corredor, J.E., 1999. Analysis of the optical properties of the Orinoco River plume by absorption and fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 66, 35–51.
- Dittmar, T., Lara, R.J., Kattner, G., 2001. River or mangrove? Tracing major organic matter sources in tropical Brazilian coastal waters. *Mar. Chem.* 73, 253–271.
- Dittmar, T., Whitehead, K., Minor, E.C., Koch, B.P., 2007. Tracing terrigenous dissolved organic matter and its photochemical decay in the ocean by using liquid chromatography/mass spectrometry. *Mar. Chem.* 107, 378–387. doi:10.1016/j.marchem.2007.04.006
- Dubois, P.S., 2012. Spécialité : Biogéochimie et Ecosystèmes MATIERE ORGANIQUE PARTICULAIRE DANS LE BASSIN D ’ ARCAÇON.
- Eisma, D., 1986. Flocculation and de-flocculation of suspended matter in estuaries. *Netherlands J. Sea Res.* 20, 183–199. doi:10.1016/0077-7579(86)90041-4
- Engebretson, R.R.R., von Wandruszka, R., 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1934–1941.
- Fellman, J.B., Petrone, K.C., Grierson, P.F., 2011. Source, biogeochemical cycling, and fluorescence characteristics of dissolved organic matter in an agro-urban estuary. *Limnol. Oceanogr.* 56, 243–256. doi:10.4319/lo.2011.56.1.0243
- Findlay, S., Sinsabaugh, R.L., 2003. *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter.* Academic Press.
- Gueguen, C., Belin, C., Dominik, J., 2002. Organic colloid separation in contrasting aquatic environments with tangential flow filtration. *Water Res.* 36, 1677–1684.

- Guéguen, C., Cuss, C.W., 2011. Characterization of aquatic dissolved organic matter by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to UV-Visible diode array and excitation emission matrix fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1218, 4188–98. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.038
- Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., 2011. Characterization of aquatic dissolved organic matter by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to UV-Visible diode array and excitation emission matrix fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1218, 4188–4198. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.038
- Guo, W., Stedmon, C. a., Han, Y., Wu, F., Yu, X., Hu, M., 2007. The conservative and non-conservative behavior of chromophoric dissolved organic matter in Chinese estuarine waters. *Mar. Chem.* 107, 357–366. doi:10.1016/j.marchem.2007.03.006
- Hassellöv, M., 2005. Relative molar mass distributions of chromophoric colloidal organic matter in coastal seawater determined by Flow Field-Flow Fractionation with UV absorbance and fluorescence detection. *Mar. Chem.* 94, 111–123. doi:10.1016/j.marchem.2004.07.012
- Hasselov, M., von der Kammer, F., Beckett, R., 2007. Characterisation of aquatic colloids and macromolecules by field-flow fractionation. *IUPAC Ser. Anal. Phys. Chem. Environ. Syst.* 10, 223.
- Hernes, P.J., Benner, R., Cowie, G.L., Goñi, M.A., Bergamaschi, B.A., Hedges, J.I., 2001. Tannin diagenesis in mangrove leaves from a tropical estuary: a novel molecular approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 3109–3122.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M., Parlanti, E., 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org. Geochem.* 40, 706. doi:10.1016/j.orggeochem.2009.03.002
- Ishii, S.K.L., Boyer, T.H., 2012. Behavior of reoccurring PARAFAC components in fluorescent dissolved organic matter in natural and engineered systems: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2006–17. doi:10.1021/es2043504
- Jalón-Rojas, I., Schmidt, S., Sottolichio, A., 2015. Turbidity in the fluvial Gironde Estuary (southwest France) based on 10-year continuous monitoring: Sensitivity to hydrological conditions. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 19, 2805–2819. doi:10.5194/hess-19-2805-2015
- Kattner, G., Lobbes, J.M., Fitznar, H.P., Engbrodt, R., Nöthig, E.-M., Lara, R.J., 1999. Tracing dissolved organic substances and nutrients from the Lena River through Laptev Sea (Arctic). *Mar. Chem.* 65, 25–39.
- Lalli, C., Parsons, T.R., 1997. *Biological Oceanography: An Introduction: An Introduction.* Butterworth-Heinemann.
- Lisitsyn, A.P., 1995. The marginal filter of the ocean. *Oceanol. Russ. Acad. Sci.* 34, 671–682.
- Martin, P., Sébastien, D., Gilles, T., Isabelle, A., de Montaudouin, X., Emery, É., Claire, N., Christophe, V., 2010. Long-term evolution (1988–2008) of *Zostera* spp. meadows in Arcachon Bay (Bay of Biscay). *Mech. SEDIMENT Retent. ESTUARIES* 87, 357–366. doi:10.1016/j.ecss.2010.01.016
- Miller, A.E.J., 1999. Seasonal Investigations of Dissolved Organic Carbon Dynamics in the Tamar Estuary, U.K. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 49, 891–908.
- Mopper, K., Feng, Z., Bentjen, S.B., Chen, R.F., 1996. Effects of cross-flow filtration on the absorption and fluorescence properties of seawater. *Mar. Chem.* 55, 53–74. doi:10.1016/S0304-4203(96)00048-5
- Moran, M.A., Pomeroy, L.R., Sheppard, E.S., Atkinson, L.P., Hodson, R.E., 1991a. Distribution of terrestrially derived dissolved organic matter on the southeastern US continental shelf. *Limnol. Ocean.* 36, 1134–1149.
- Moran, M.A., Wicks, R.J., Hodson, R.E., 1991b. Export of dissolved organic matter from a mangrove swamp ecosystem : evidence from natural fluorescence , dissolved lignin phenols , and bacterial secondary production.
- Mueller, H., Ayukai, T., 1998. Concentration and molecular weight distribution of dissolved organic carbon in a mangrove creek in the Hinchinbrook area , Australia 231–235.
- Murphy, K.R., Stedmon, C.A., Waite, T.D., Ruiz, G.M., 2008. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 108, 40–58. doi:10.1016/j.marchem.2007.10.003
- Nebbioso, A., Piccolo, A., 2013. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 109–124. doi:10.1007/s00216-012-6363-2
- Pelekani, C., Newcombe, G., Snoeying, V.L., Hepplewhite, C., Assemi, S., Beckett, R., 1999. Characterization of Natural Organic Matter Using High Performance Size Exclusion Chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2807–2813.
- Pifer, A.D., Miskin, D.R., Cousins, S.L., Fairey, J.L., 2011. Coupling asymmetric flow-field flow fractionation and fluorescence parallel factor analysis reveals stratification of dissolved organic matter in a drinking water reservoir. *J. Chromatogr. A* 1218, 4167–4178. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.039

- Plus, M., Maurer, D., Stanisiere, J.-Y., Dumas, F., 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d'une lagune mésotidale, le Bassin d'Arcachon.
- Rimmelin, P., Dumon, J.-C., Maneux, E., Gonçalves, A., 1998. Study of annual and seasonal dissolved inorganic nitrogen inputs into the Arcachon Lagoon, Atlantic Coast (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47, 649–659.
- Romera-castillo, C., Chen, M., Yamashita, Y., Jaffe, R., 2014. Fluorescence characteristics of size-fractionated dissolved organic matter: Implications for a molecular assembly based structure? 5. doi:10.1016/j.watres.2014.02.017
- Sautour, B., Castel, J., 1995. Comparative spring distribution of zooplankton in three macrotidal European estuaries. *Hydrobiologia* 311, 139–151.
- Schimpf, M.E., Caldwell, K., Giddings, J.C., 2000. *Field-flow fractionation handbook*. John Wiley & Sons.
- Scully, N.M., Lean, D.R.S., 1994. The attenuation of ultraviolet radiation in temperate lakes. (With 8 figures and 5 tables). *Ergebnisse der Limnol.* 135–144.
- Shimotori, K., Omori, Y., Hama, T., 2009. Bacterial production of marine humic-like fluorescent dissolved organic matter and its biogeochemical importance. *Aquat. Microb. Ecol.* 58, 55–66. doi:10.3354/ame01350
- Sholkovitz, E.R., 1978. The flocculation of dissolved Fe, Mn, Al, Cu, Ni, Co and Cd during estuarine mixing. *Earth Planet. Sci. Lett.* 41, 77–86. doi:10.1016/0012-821X(78)90043-2
- Sholkovitz, E.R., 1976. Flocculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40, 831–845.
- Sholkovitz, E.R., Boyle, E.A., Price, N.B., 1978. The removal of dissolved humic acids and iron during estuarine mixing. *Earth Planet. Sci. Lett.* 40, 130–136.
- Sholkovitz, E.R., Copland, D., 1981. The coagulation, solubility and adsorption properties of Fe, Mn, Cu, Ni, Cd, Co and humic acids in a river water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 181–189. doi:10.1016/0016-7037(81)90161-7
- Sottolichio, A., Castaing, P., 1999. A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. IIA - Earth Planet. Sci.* 329, 795–800. doi:10.1016/S1251-8050(00)88634-6
- Stedmon, C.A., Markager, S., 2005. Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnol. Ocean.* 50, 686–697.
- Stolpe, B., Guo, L., Shiller, A.M., Hassellöv, M., 2010. Size and composition of colloidal organic matter and trace elements in the Mississippi River, Pearl River and the northern Gulf of Mexico, as characterized by flow field-flow fractionation. *Mar. Chem.* 118, 119–128. doi:10.1016/j.marchem.2009.11.007
- Stolpe, B., Zhou, Z., Guo, L., Shiller, A.M., 2014. Colloidal size distribution of humic- and protein-like fluorescent organic matter in the northern Gulf of Mexico. *Mar. Chem.* 164, 25–37. doi:10.1016/j.marchem.2014.05.007
- Takács, M., Alberts, J.J., Egeberg, P.K., 1999. Characterization of natural organic matter from eight Norwegian surface waters: proton and copper binding. *Environ. Int.* 25, 315–323.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 15, 463–466. doi:10.1021/es00086a012
- Uncles, R.J., Stephens, J.A., Law, D.J., 2006. Turbidity maximum in the macrotidal, highly turbid Humber Estuary, UK: Floccs, fluid mud, stationary suspensions and tidal bores. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 67, 30–52. doi:10.1016/j.eccs.2005.10.013
- Wells, M.L., 2002. Marine colloids and trace metals. *Biogeochem. Mar. dissolved Org. matter* 367–404.
- Yamashita, Y., Jaffe, R., Jaffé, R., Maie, N., Tanoue, E., 2008. Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC). *Limnol. Oceanogr.* 53, 1900–1908. doi:10.4319/lo.2008.53.5.1900
- Yan, M., Fu, Q., Li, D., Gao, G., Wang, D., 2013. Study of the pH influence on the optical properties of dissolved organic matter using fluorescence excitation–emission matrix and parallel factor analysis. *J. Lumin.* 142, 103–109. doi:10.1016/j.jlumin.2013.02.052
- Yan, M., Korshin, G., Wang, D., Cai, Z., 2012. Characterization of dissolved organic matter using high-performance liquid chromatography (HPLC) size exclusion chromatography (SEC) with a multiple wavelength absorbance detector. *Chemosphere* 87, 879–885. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.029
- Zanardi-Lamardo, E., Moore, C.A., Zika, R.G., 2004. Seasonal variation in molecular mass and optical properties of chromophoric dissolved organic material in coastal waters of southwest Florida. *Mar. Chem.* 89, 37–54. doi:10.1016/j.marchem.2004.02.018

Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38, 45–50. doi:10.1016/S0045-6535(98)00166-0



Annexe 3: Ensemble des résultats obtenus par spectroscopie UV/Vis et de fluorescence, analyse PARAFAC (C1-C6) carbone organique dissous (DOC) et de masse moléculaire moyenne par AF4 pour les campagnes de septembre 2015 (Summer) et Avril 2016 (Winter) dans la Seine.

Name	Season	Depth	Position	Tide	Salinity	Temperature	DOC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	$\alpha'/\alpha$	$\beta/\alpha$	$\gamma/\alpha$	$\alpha'$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
TT1SW	Winter	Surface	Tancarville	LT	0.3	13.1	2.83	0.204	0.172	0.120	0.233	0.025	0.071	2.540	1.288	0.552	0.371	0.146	0.188	0.081
TT2SW	Winter	Surface	Tancarville	ET	0.4	12.8	3.14	0.212	0.181	0.127	0.259	0.023	0.076	2.560	1.289	0.590	0.391	0.153	0.197	0.090
TT3SW	Winter	Surface	Tancarville	HT	0.5	12.9	2.97	0.210	0.180	0.126	0.243	0.024	0.076	2.569	1.296	0.564	0.386	0.150	0.195	0.085
TT1FW	Winter	Fond	Tancarville	LT	0.3	13.3	2.52	0.199	0.168	0.117	0.229	0.025	0.075	2.559	1.284	0.555	0.366	0.143	0.184	0.079
TT2FW	Winter	Fond	Tancarville	ET	0.4	13.1	2.60	0.213	0.181	0.127	0.255	0.020	0.079	2.543	1.280	0.572	0.389	0.153	0.196	0.087
TT3FW	Winter	Fond	Tancarville	HT	0.6	13.0	2.66	0.212	0.180	0.126	0.239	0.021	0.081	2.565	1.282	0.544	0.389	0.152	0.195	0.083
FT1SW	Winter	Surface	Fatouville	LT	0.4	13.2	3.27	0.231	0.194	0.135	0.323	0.023	0.080	2.537	1.275	0.679	0.419	0.165	0.210	0.112
FT3SW	Winter	Surface	Fatouville	HT	12.0	11.9	2.43	0.212	0.186	0.128	0.266	0.021	0.069	2.502	1.406	0.218	0.321	0.128	0.181	0.028
FT2SW	Winter	Surface	Fatouville	ET	5.0	12.7	2.53	0.173	0.160	0.105	0.226	0.017	0.066	2.471	1.255	0.594	0.382	0.154	0.194	0.092
FT1FW	Winter	Fond	Fatouville	LT	0.4	13.3	2.94	0.227	0.189	0.131	0.308	0.020	0.082	2.537	1.261	0.653	0.415	0.164	0.207	0.107
FT3FW	Winter	Fond	Fatouville	HT	21.1	11.1	1.85	0.111	0.111	0.071	0.138	0.015	0.049	2.578	1.401	0.208	0.220	0.085	0.120	0.018
FT2FW	Winter	Fond	Fatouville	ET	8.5	12.4	3.18	0.199	0.178	0.120	0.241	0.018	0.066	2.510	1.240	0.577	0.367	0.146	0.181	0.084
HT3SW	Winter	Surface	Honfleur	HT	19.5	11.8	1.94	0.128	0.122	0.079	0.188	0.012	0.054	2.595	1.242	0.668	0.248	0.095	0.119	0.064
HT2SW	Winter	Surface	Honfleur	ET	6.3	12.7	2.51	0.210	0.190	0.123	0.213	0.019	0.080	2.487	1.229	0.511	0.391	0.157	0.193	0.080
HT1SW	Winter	Surface	Honfleur	LT	0.6	13.1	2.68	0.236	0.198	0.136	0.248	0.024	0.075	2.478	1.267	0.515	0.416	0.168	0.213	0.086
HT3FW	Winter	Fond	Honfleur	HT	25.8	10.9	1.75	0.084	0.086	0.055	0.141	0.010	0.038	2.587	1.247	0.742	0.168	0.065	0.081	0.048
HT2FW	Winter	Fond	Honfleur	ET	6.4	12.9	2.66	0.211	0.187	0.123	0.250	0.017	0.071	2.480	1.226	0.566	0.381	0.154	0.188	0.087
HT1FW	Winter	Fond	Honfleur	LT	0.9	13.3	2.73	0.221	0.177	0.129	0.260	0.024	0.073	2.521	1.297	0.573	0.390	0.155	0.201	0.089
T1SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.7	2.73	0.196	0.162	0.111	0.400	0.024	0.067	2.543	1.286	1.008	0.351	0.138	0.177	0.139
T2SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.6	2.55	0.200	0.165	0.116	0.309	0.024	0.072	2.547	1.296	0.749	0.361	0.142	0.184	0.106
T3SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.6	2.48	0.196	0.161	0.113	0.290	0.026	0.068	2.522	1.292	0.701	0.352	0.140	0.180	0.098
T4SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.6	2.41	0.183	0.142	0.107	0.314	0.025	0.063	2.538	1.322	0.812	0.328	0.129	0.171	0.105
T5SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.5	2.43	0.196	0.162	0.114	0.267	0.025	0.059	2.450	1.146	0.646	0.347	0.142	0.162	0.091
T6SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.5	2.41	0.200	0.160	0.114	0.288	0.017	0.065	2.495	1.270	0.677	0.354	0.142	0.180	0.096
T7SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.3	2.49	0.198	0.162	0.113	0.252	0.025	0.064	2.482	1.276	0.607	0.353	0.142	0.181	0.086
T8SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.4	2.50	0.201	0.164	0.114	0.263	0.012	0.062	2.462	1.266	0.624	0.352	0.143	0.181	0.089
T9SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.3	2.50	0.199	0.165	0.113	0.256	0.029	0.069	2.498	1.272	0.618	0.360	0.144	0.184	0.089
T10SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.1	2.51	0.199	0.166	0.113	0.258	0.028	0.063	2.480	1.269	0.624	0.356	0.143	0.182	0.089
T11SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.1	2.49	0.195	0.150	0.111	0.257	0.007	0.061	2.845	1.289	0.633	0.382	0.134	0.173	0.085
T12SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.0	2.52	0.206	0.171	0.120	0.265	0.012	0.070	2.510	1.276	0.605	0.370	0.147	0.188	0.089
T13SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	12.9	2.55	0.214	0.169	0.120	0.278	0.002	0.065	2.411	1.250	0.614	0.364	0.151	0.188	0.093
T14SW	Winter	Surface	Transect	-	0.3	13.0	2.51	0.216	0.169	0.120	0.301	0.000	0.067	2.409	1.230	0.655	0.369	0.153	0.189	0.100

Name	$\alpha'$ /COD	$\alpha$ /COD	$\beta$ /COD	$\gamma$ /COD	HIX	BIX	OHNO	f450/f500	a254	E2/E3	E4/E6	aromaticity	SUVA	aromaticity/SUVA	S275-295	S350-400	SR	MW
TT1SW	0.131	0.052	0.067	0.029	9.19	0.66	0.9	1.28	17.61	5.72	277.04	18.80	2.70	21.17	0.0144	0.0170	0.85	2293.2
TT2SW	0.124	0.049	0.063	0.029	8.89	0.68	0.9	1.29	17.75	5.63	5.72	17.72	2.45	19.55	0.0147	0.0171	0.86	2253.8
TT3SW	0.130	0.051	0.066	0.028	9.14	0.68	0.9	1.28	17.26	5.80	8.35	17.97	2.52	19.98	0.0147	0.0173	0.85	2253.8
TT1FW	0.145	0.057	0.073	0.031	8.91	0.67	0.9	1.28	19.79	4.00	1.64	22.52	3.41	25.74	0.0133	0.0148	0.90	2254.8
TT2FW	0.149	0.059	0.075	0.034	8.78	0.68	0.9	1.29	17.71	5.26	1.40	20.15	2.95	22.79	0.0142	0.0201	0.71	2215.9
TT3FW	0.146	0.057	0.073	0.031	8.97	0.67	0.9	1.28	19.29	4.56	1.61	21.15	3.15	24.08	0.0139	0.0170	0.82	2254.8
FT1SW	0.128	0.050	0.064	0.034	8.42	0.67	0.89	1.28	19.39	5.65	19.94	18.26	2.57	20.33	0.0146	0.0168	0.87	2313.1
FT3SW	0.132	0.053	0.074	0.012	8.4	0.68	0.89	1.27	16.55	4.75	2.57	20.02	2.96	22.84	0.0144	0.0154	0.93	1735.4
FT2SW	0.151	0.061	0.076	0.036	8.87	0.68	0.9	1.28	18.19	5.55	-163.99	20.63	3.12	23.86	0.0141	0.0160	0.88	2500.8
FT1FW	0.141	0.056	0.070	0.036	8.23	0.67	0.89	1.28	20.63	4.98	1.88	20.64	3.05	23.42	0.0142	0.0175	0.81	2254.8
FT3FW	0.119	0.046	0.065	0.010	8.71	0.69	0.9	1.26	11.47	4.34	1.79	18.97	2.70	21.12	0.0150	0.0154	0.98	1704.6
FT2FW	0.115	0.046	0.057	0.026	9.27	0.68	0.9	1.28	19.22	4.25	1.53	18.74	2.62	20.63	0.0139	0.0161	0.86	2274.5
HT3SW	0.127	0.049	0.061	0.033	8.33	0.69	0.89	1.26	12.65	5.46	16.06	19.29	2.83	21.97	0.0149	0.0154	0.97	1664.2
HT2SW	0.156	0.063	0.077	0.032	9.66	0.67	0.91	1.27	18.67	5.05	2.71	21.18	3.23	24.59	0.0143	0.0165	0.86	2500.8
HT1SW	0.156	0.063	0.080	0.032	9.55	0.66	0.91	1.28	18.76	5.74	6.95	20.33	3.04	23.39	0.0145	0.0174	0.83	2293.2
HT3FW	0.096	0.037	0.046	0.028	7.47	0.71	0.88	1.26	11.54	4.04	1.76	19.91	2.87	22.26	0.0137	0.0142	0.97	1648.6
HT2FW	0.143	0.058	0.071	0.033	9.02	0.67	0.9	1.27	22.47	4.11	2.08	23.57	3.67	27.43	0.0131	0.0145	0.90	1944.9
HT1FW	0.143	0.057	0.073	0.032	8.62	0.67	0.9	1.3	22.05	3.15	1.06	23.38	3.50	26.36	0.0147	0.0232	0.63	2196.8
T1SW	0.129	0.051	0.065	0.051	6.55	0.66	0.87	1.29	21.71	4.09	2.50	22.70	3.46	26.08	0.0139	0.0133	1.04	2340.5
T2SW	0.142	0.056	0.072	0.042	7.92	0.68	0.89	1.29	18.65	4.65	2.51	21.16	3.18	24.24	0.0141	0.0151	0.94	2431.0
T3SW	0.142	0.056	0.073	0.039	7.71	0.67	0.89	1.3	17.35	5.09	3.63	20.44	3.04	23.35	0.0142	0.0157	0.90	2450.7
T4SW	0.136	0.054	0.071	0.044	7.11	0.68	0.88	1.32	16.62	4.34	1.66	20.63	3.00	23.07	0.0141	0.0153	0.92	2450.7
T5SW	0.143	0.058	0.067	0.038	8.33	0.67	0.89	1.3	17.88	5.01	3.37	21.10	3.19	24.33	0.0142	0.0151	0.94	2656.7
T6SW	0.147	0.059	0.075	0.040	7.81	0.67	0.89	1.31	17.04	5.13	2.73	20.56	3.07	23.53	0.0144	0.0165	0.87	2743.9
T7SW	0.142	0.057	0.073	0.035	8.49	0.66	0.89	1.3	17.41	4.97	2.70	20.48	3.03	23.32	0.0141	0.0163	0.87	2721.8
T8SW	0.141	0.057	0.072	0.036	8.34	0.68	0.89	1.3	16.85	5.71	17.60	19.79	2.92	22.61	0.0144	0.0170	0.85	2614.1
T9SW	0.144	0.058	0.073	0.036	8.71	0.66	0.9	1.3	17.12	5.22	4.22	20.04	2.97	22.89	0.0140	0.0166	0.84	2614.1
T10SW	0.142	0.057	0.073	0.036	8.62	0.66	0.9	1.29	17.64	4.76	2.71	20.59	3.05	23.43	0.0143	0.0155	0.92	2510.7
T11SW	0.154	0.054	0.070	0.034	8.17	0.67	0.89	1.32	16.12	5.73	5.93	19.35	2.81	21.90	0.0146	0.0176	0.83	2593.1
T12SW	0.147	0.059	0.075	0.035	8.63	0.68	0.9	1.28	17.75	5.10	3.79	20.47	3.06	23.48	0.0141	0.0159	0.89	2614.1
T13SW	0.142	0.059	0.074	0.036	8.41	0.68	0.89	1.3	17.59	5.14	4.39	20.22	2.99	23.06	0.0140	0.0166	0.85	2635.3
T14SW	0.147	0.061	0.075	0.040	8.15	0.69	0.89	1.31	17.63	5.11	4.34	20.47	3.05	23.40	0.0142	0.0163	0.87	2635.3



<i>Name</i>	<i>Season</i>	<i>Depth</i>	<i>Position</i>	<i>Tide</i>	<i>Salinity</i>	<i>Temperature</i>	<i>DOC</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	$\alpha'/\alpha$	$\beta/\alpha$	$\gamma/\alpha$	$\alpha'$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
<i>CT1SS</i>	Summer	Surface	Caudebec	LT	0.3	16.9	2.15	0.166	0.160	0.146	0.337	0.092	0.095	2.803	1.749	0.543	0.382	0.136	0.238	0.074
<i>CT2SS</i>	Summer	Surface	Caudebec	ET	0.3	16.9	2.20	0.165	0.137	0.123	0.283	0.076	0.069	2.525	1.575	0.463	0.331	0.131	0.206	0.061
<i>CT3SS</i>	Summer	Surface	Caudebec	HT	0.3	17.0	2.05	0.175	0.152	0.135	0.277	0.082	0.108	2.731	1.420	0.683	0.390	0.143	0.203	0.098
<i>TT1SS</i>	Summer	Surface	Tancarville	LT	0.5	16.7	2.04	0.167	0.147	0.127	0.281	0.082	0.076	2.639	1.439	0.730	0.352	0.133	0.192	0.097
<i>TT3SS</i>	Summer	Surface	Tancarville	HT	10.8	16.5	1.95	0.101	0.100	0.074	0.169	0.030	0.048	2.639	1.328	0.696	0.215	0.082	0.108	0.057
<i>TT2SS</i>	Summer	Surface	Tancarville	ET	2.0	16.6	1.86	0.163	0.150	0.121	0.255	0.074	0.072	2.564	1.401	0.679	0.337	0.131	0.184	0.089
<i>FT2SS</i>	Summer	Surface	Fatouville	ET	13.7	17.0	1.73	0.108	0.108	0.085	0.206	0.039	0.055	2.643	1.391	0.810	0.231	0.087	0.122	0.071
<i>FT3SS</i>	Summer	Surface	Fatouville	HT	18.9	16.5	1.61	0.091	0.093	0.075	0.170	0.034	0.044	2.625	1.420	0.789	0.195	0.074	0.105	0.059
<i>FT1SS</i>	Summer	Surface	Fatouville	LT	1.6	16.6	1.96	0.153	0.149	0.117	0.258	0.082	0.084	2.696	1.382	0.718	0.344	0.128	0.177	0.092
<i>HT2SS</i>	Summer	Surface	Honfleur	ET	15.5	16.9	1.70	0.090	0.087	0.074	0.169	0.030	0.041	2.633	1.420	0.788	0.189	0.072	0.102	0.057
<i>HT1SS</i>	Summer	Surface	Honfleur	BT	6.3	16.5	2.19	0.137	0.129	0.106	0.230	0.056	0.082	2.716	1.399	0.701	0.302	0.111	0.155	0.078
<i>HT3SS</i>	Summer	Surface	Honfleur	HT	20.8	16.7	1.57	0.080	0.082	0.066	0.135	0.026	0.046	2.825	1.406	0.712	0.183	0.065	0.091	0.046
<i>CT1FS</i>	Summer	Bottom	Caudebec	LT	0.3	16.9	2.14	0.168	0.149	0.130	0.309	0.082	0.075	2.526	1.538	0.470	0.350	0.139	0.213	0.065
<i>CT2FS</i>	Summer	Bottom	Caudebec	ET	0.3	16.9	2.07	0.164	0.142	0.127	0.268	0.076	0.076	2.620	1.611	0.285	0.343	0.131	0.211	0.037
<i>CT3FS</i>	Summer	Bottom	Caudebec	HT	0.3	17.1	1.95	0.163	0.142	0.129	0.296	0.085	0.170	2.555	1.407	0.704	0.361	0.141	0.199	0.100
<i>TT1FS</i>	Summer	Bottom	Tancarville	LT	0.8	16.6	2.11	0.167	0.147	0.129	0.304	0.084	0.077	2.621	1.432	0.751	0.355	0.135	0.194	0.102
<i>TT3FS</i>	Summer	Bottom	Tancarville	HT	18.9	16.1	1.82	0.133	0.132	0.099	0.192	0.053	0.073	2.753	1.359	0.620	0.299	0.109	0.148	0.067
<i>TT2FS</i>	Summer	Bottom	Tancarville	ET	3.0	16.6	1.88	0.156	0.145	0.113	0.232	0.070	0.078	2.711	1.376	0.657	0.341	0.126	0.173	0.083
<i>FT3FS</i>	Summer	Bottom	Fatouville	HT	25.1	17.0	1.39	0.064	0.067	0.055	0.183	0.021	0.036	2.649	1.502	0.659	0.142	0.053	0.080	0.035
<i>FT1FS</i>	Summer	Bottom	Fatouville	LT	1.8	16.4	1.90	0.153	0.150	0.116	0.231	0.083	0.083	2.678	1.383	0.645	0.343	0.128	0.177	0.083
<i>FT2FS</i>	Summer	Bottom	Honfleur	ET	17.9	16.3	1.52	0.111	0.112	0.085	0.240	0.041	0.060	2.603	1.415	0.789	0.187	0.072	0.102	0.057
<i>HT1FS</i>	Summer	Bottom	Honfleur	BT	6.9	16.9	1.99	0.140	0.129	0.108	0.232	0.054	0.079	2.675	1.399	0.713	0.300	0.112	0.157	0.080
<i>HT3FS</i>	Summer	Bottom	Honfleur	HT	24.6	16.5	1.53	0.068	0.070	0.054	0.141	0.019	0.035	2.675	1.350	0.855	0.149	0.056	0.075	0.048
<i>HT2FS</i>	Summer	Bottom	Honfleur	LT	24.6	16.6	1.53	0.090	0.087	0.074	0.169	0.030	0.041	2.675	1.350	0.855	0.149	0.056	0.075	0.048

<i>Name</i>	$\alpha$ /COD	$\alpha$ /COD	$\beta$ /COD	$\gamma$ /COD	HIX	BIX	OHNO	<i>f</i> <sub>450</sub> / <i>f</i> <sub>500</sub>	254nm	E2/E3	E4/E6	aromaticity	SUVA	aromaticity SUVA	S275-295	S350-400	SR	MW
CT1SS	0.178	0.063	0.111	0.034	6.61	0.73	0.87	1.41	14.40	4.96	1.80	20.12	2.91	22.50	0.0146	0.0174	0.84	2041.4
CT2SS	0.150	0.060	0.094	0.028	6.72	0.72	0.87	1.38	3.92	1.57	2.14	18.87	0.77	8.63	0.0150	0.0170	0.88	1990.6
CT3SS	0.191	0.070	0.099	0.048	7.62	0.75	0.88	1.37	12.09	4.56	1.31	18.85	2.57	20.27	0.0144	0.0181	0.80	1915.2
TT1SS	0.172	0.065	0.094	0.048	7.3	0.73	0.88	1.37	13.44	6.12	7.35	19.41	2.86	22.19	0.0144	0.0178	0.81	1877.1
TT3SS	0.110	0.042	0.055	0.029	7.6	0.75	0.88	1.34	12.15	4.22	1.90	19.12	2.70	21.14	0.0145	0.0145	1.00	1674.3
TT2SS	0.181	0.071	0.099	0.048	7.55	0.72	0.88	1.35	13.03	5.67	2.52	20.35	3.04	23.37	0.0147	0.0185	0.79	1800.0
FT2SS	0.134	0.051	0.070	0.041	6.86	0.75	0.87	1.32	9.91	5.55	3.27	17.81	2.49	19.77	0.0155	0.0165	0.94	1664.2
FT3SS	0.121	0.046	0.065	0.036	6.96	0.77	0.87	1.32	8.19	6.25	-47.01	16.52	2.21	17.95	0.0165	0.0172	0.96	1621.5
FT1SS	0.175	0.065	0.090	0.047	7.87	0.72	0.89	1.36	13.01	4.50	1.52	20.13	2.88	22.29	0.0144	0.0167	0.86	1864.4
HT2SS	0.111	0.042	0.060	0.033	6.75	0.78	0.87	1.34	9.22	5.76	14.83	17.22	2.36	18.91	0.0156	0.0161	0.97	1667.9
HT1SS	0.138	0.051	0.071	0.036	6.81	0.74	0.87	1.36	11.23	6.03	7.81	16.86	2.23	18.10	0.0153	0.0176	0.87	1711.5
HT3SS	0.116	0.041	0.058	0.029	7.46	0.79	0.88	1.32	7.82	5.37	2.46	16.29	2.16	17.63	0.0159	0.0161	0.99	1682.2
CT1FS	0.164	0.065	0.100	0.030	7.05	0.73	0.88	1.39	15.41	4.82	1.45	21.29	3.13	23.93	0.0141	0.0180	0.78	2007.4
CT2FS	0.166	0.063	0.102	0.018	7.27	0.73	0.88	1.39	12.91	5.57	21.73	19.12	2.71	21.20	0.0145	0.0164	0.88	2041.3
CT3FS	0.185	0.072	0.102	0.051	7.36	0.72	0.88	1.38	11.87	5.43	1.55	18.85	2.64	20.75	0.0151	0.0193	0.78	2041.4
TT1FS	0.168	0.064	0.092	0.048	6.82	0.73	0.87	1.4	13.18	5.53	2.71	19.18	2.71	21.24	0.0147	0.0170	0.87	1861.5
TT3FS	0.165	0.060	0.081	0.037	8.47	0.73	0.89	1.32	9.95	4.32	1.91	17.51	2.38	19.04	0.0151	0.0142	1.07	1674.3
TT2FS	0.181	0.067	0.092	0.044	8.34	0.72	0.89	1.35	12.35	4.78	2.16	20.02	2.85	22.14	0.0140	0.0166	0.84	1770.1
FT3FS	0.102	0.038	0.058	0.025	5.36	0.78	0.84	1.31	6.44	6.21	12.57	15.50	2.01	16.67	0.0169	0.0176	0.96	1621.5
FT1FS	0.180	0.067	0.093	0.043	8.2	0.71	0.89	1.37	13.45	4.06	1.67	21.11	3.07	23.59	0.0143	0.0144	0.99	1831.3
FT2FS	0.123	0.047	0.067	0.037	6.68	0.78	0.87	1.33	8.15	6.44	-14.14	16.98	2.33	18.74	0.0162	0.0172	0.94	1621.5
HT1FS	0.150	0.056	0.079	0.040	6.86	0.75	0.87	1.34	12.44	4.79	2.33	19.07	2.71	21.20	0.0145	0.0154	0.95	1693.2
HT3FS	0.098	0.036	0.049	0.031	6.44	0.79	0.87	1.3	6.98	5.77	57.51	15.38	1.98	16.48	0.0168	0.0150	1.12	1649.8
HT2FS	0.098	0.036	0.049	0.031	6.44	0.79	0.87	1.3	6.98	5.77	57.51	15.38	1.98	16.48	0.0168	0.0150	1.12	1649.8



## Références

- Abbt-Braun, G., Lankes, U., Frimmel, F.H., 2004. Structural characterization of aquatic humic substances The need for a multiple method approach. *Aquat. Sci.* 66, 151–170.
- Abril, G., Etcheber, H., Le Hir, P., Bassoullet, P., Boutier, B., Frankignoulle, M., Talence, F., Hir, P. Le, Bassoullet, P., Boutier, B., Frankignoulle, M., Abril, G., Etcheber, H., Le Hir, P., Bassoullet, P., Boutier, B., Frankignoulle, M., Hir, P. Le, Bassoullet, P., Boutier, B., Frankignoulle, M., 1999. Oxic/anoxic oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde, France). *Limnol. Ocean.* 44, 1304–1315. doi:10.4319/lo.1999.44.5.1304
- Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E., Brogueira, M.J., 2002. Behaviour of Organic Carbon in Nine Contrasting European Estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 54, 241–262. doi:http://dx.doi.org/10.1006/ecss.2001.0844
- Aiken, G., Cotsaris, E., 1995. Soil and hydrology: their effect on NOM: Natural organic matter. *Journal-American Water Work. Assoc.* 87, 36–45.
- Aiken, G.R., 1985. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances, in: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., McCarthy, P. (Eds.), . John Wiley New York, pp. 363–385.
- Aiken, G.R., Hsu-Kim, H., Ryan, J.N., 2011. Influence of dissolved organic matter on the environmental fate of metals, nanoparticles, and colloids. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3196–201. doi:10.1021/es103992s
- Aiken, G.R., McKnight, D.M., Thorn, K.A., Thurman, E.M., 1992. Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins. *Org. Geochem.* 18, 567–573.
- Aitkenhead-Peterson, J.A., McDowell, W.H., Neff, J.C., Stuart, E., Robert, L., 2003. Sources, production, and regulation of allochthonous dissolved organic matter inputs to surface waters. *Aquat. Ecosyst. interactivity dissolved Org. matter* 26–70.
- Akagi, J., Zsolnay, A., Bastida, F., 2007. Quantity and spectroscopic properties of soil dissolved organic matter (DOM) as a function of soil sample treatments: air-drying and pre-incubation. *Chemosphere* 69, 1040–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.036
- Akkanen, J., 2002. Does dissolved organic matter matter? Implications for bioavailability of organic chemicals. Joensuu.
- Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A., Kukkonen, J.V.K., 2005. Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: Effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* 60, 1608–1615.
- Akkanen, J., Vogt, R.D., Kukkonen, J.K.J.V.K., 2004. Essential characteristics of natural dissolved organic matter affecting the sorption of hydrophobic organic contaminants. *Aquat. Sci. - Res. Across Boundaries* 66, 171. doi:10.1007/s00027-004-0705-x
- Alasonati, E., Benincasa, M.-A., Slaveykova, V.I., 2007. Asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to multiangle laser light scattering detector: Optimization of crossflow rate, carrier characteristics, and injected mass in alginate separation. *J. Sep. Sci.* 30, 2332–2340. doi:10.1002/jssc.200700211
- Alasonati, E., Slaveykova, V.I., Gallard, H., Croué, J.-P., Benedetti, M.F., 2010. Characterization of the colloidal organic matter from the Amazonian basin by asymmetrical flow field-flow fractionation and size exclusion chromatography. *Water Res.* 44, 223–231. doi:10.1016/j.watres.2009.09.010
- Alasonati, E., Stolpe, B., Benincasa, M.-A., Hassellöv, M., 2006. Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation–Multidetector System as a Tool for Studying Metal–Alginate Interactions. *Environ. Chem.* 3, 192–198. doi:10.1071/EN06024
- Alberts, J.J., Takacs, M., 2004. Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Org. Geochem.* 35, 1141–1149.
- Alberts, J.J.J., Takács, M., Egeberg, P.K.P.K., Takacs, M., Egeberg, P.K.P.K., 2002. Total luminescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC). *Org. Geochem.* 33, 817–828. doi:10.1016/S0146-

- Allen, G.P., Castaing, P., Klingebiel, A., 1972. Distinction of elementary sand populations in the Gironde estuary (France) by r-mode factor analysis of grain-size data. *Sedimentology* 19, 21–35.
- Alling, V., Sanchez-Garcia, L., Porcelli, D., Pugach, S., Vonk, J.E., van Dongen, B., Mörth, C., Anderson, L.G., Sokolov, A., Andersson, P., 2010. Nonconservative behavior of dissolved organic carbon across the Laptev and East Siberian seas. *Global Biogeochem. Cycles* 24.
- Aluwihare, L.I., Repeta, D.J., Chen, R.F., 2002. Chemical composition and cycling of dissolved organic matter in the Mid-Atlantic Bight. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 49, 4421–4437.
- Alvarez-Puebla, R.A., Valenzuela-Calahorra, C., Garrido, J.J., 2006. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation: a molecular modelling approach. *Sci. Total Environ.* 358, 243–254.
- Aminot, Y., 2013. Étude de l'impact des effluents urbains sur la qualité des eaux de la Garonne estuarienne : application aux composés pharmaceutiques et aux filtres UV. <http://www.theses.fr>. Bordeaux 1.
- Amon, R.M.W., Benner, R., 1996. Photochemical and microbial consumption of dissolved organic carbon and dissolved oxygen in the Amazon River. *Geochim. Cosmochim. Acta*.
- Amy, G., Drewes, J., 2007. Soil Aquifer Treatment (SAT) as a Natural and Sustainable Wastewater Reclamation/Reuse Technology: Fate of Wastewater Effluent Organic Matter (EfOM) and Trace Organic Compounds. *Environ. Monit. Assess.* 129, 19–26. doi:10.1007/s10661-006-9421-4
- Andrew, A.A., Del Vecchio, R., Subramaniam, A., Blough, N. V., 2013. Chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Equatorial Atlantic Ocean: optical properties and their relation to CDOM structure and source. *Mar. Chem.* 148, 33–43.
- Asmala, E., Autio, R., Kaartokallio, H., Pitkänen, L., Stedmon, C. a., Thomas, D.N., 2013. Bioavailability of riverine dissolved organic matter in three Baltic Sea estuaries and the effect of catchment land-use. *Biogeosciences Discuss.* 10, 9819–9865. doi:10.5194/bgd-10-9819-2013
- Asmala, E., Bowers, D.G., Autio, R., Kaartokallio, H., Thomas, D.N., 2014. Qualitative changes of riverine dissolved organic matter at low salinities due to flocculation. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 119, 2014JG002722. doi:10.1002/2014JG002722
- Asmala, E., Kaartokallio, H., Carstensen, J., Thomas, D.N., 2016. Variation in Riverine Inputs Affect Dissolved Organic Matter Characteristics throughout the Estuarine Gradient. *Front. Mar. Sci.*
- Asmala, E., Stedmon, C. a., Thomas, D.N., 2012. Linking CDOM spectral absorption to dissolved organic carbon concentrations and loadings in boreal estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 111, 107–117. doi:10.1016/j.ecss.2012.06.015
- Assemi, S., Newcombe, G., Hepplewhite, C., Beckett, R., 2004. Characterization of natural organic matter fractions separated by ultrafiltration using flow field-flow fractionation. *Water Res.* 38, 1467–1476. doi:10.1016/j.watres.2003.11.031
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* 4, 634–641.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Estuaries* 50.
- Baalousha, M., Kammer, F.V.D., Motelica-Heino, M., Hilal, H.S., Le Coustumer, P., 2006a. Size fractionation and characterization of natural colloids by flow-field flow fractionation coupled to multi-angle laser light scattering. *J. Chromatogr. A* 1104, 272–281. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.095
- Baalousha, M., Lead, J.R.R., 2007a. Characterization of Natural Aquatic Colloids (<5 nm) by Flow-Field Flow Fractionation and Atomic Force Microscopy. *Env. Sci Technol.* 41, 1111–1117. doi:10.1021/es061766n
- Baalousha, M., Lead, J.R.R., 2007b. Size fractionation and characterization of natural aquatic colloids and nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 386, 93–102. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.05.039
- Baalousha, M., Stolpe, B., Lead, J.R., 2011. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: a critical review. *J. Chromatogr. A* 1218, 4078–103. doi:10.1016/j.chroma.2011.04.063

- Baalousha, M., V. D. Kammer, F., Motelica-Heino, M., Baborowski, M., Hofmeister, M., Le Coustumer, P., 2006b. Size-Based Speciation of Natural Colloidal Particles by Flow Field Flow Fractionation, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy, and Transmission Electron Microscopy/X-ray Energy Dispersive Spectroscopy: Colloids-Trace Element Interaction. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2156–2162. doi:10.1021/es051498d
- Baalousha, M., V. D. Kammer, F., Motelica-Heino, M., Le Coustumer, P., 2005. Natural sample fractionation by FIFFF–MALLS–TEM: Sample stabilization, preparation, pre-concentration and fractionation. *J. Chromatogr. A* 1093, 156–166. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.103
- Babin, M., Stramski, D., Ferrari, G.M., Claustre, H., Bricaud, A., Obolensky, G., Hoepffner, N., 2003. Variations in the light absorption coefficients of phytoplankton, nonalgal particles, and dissolved organic matter in coastal waters around Europe. *J. Geophys. Res.* 108, 3211. doi:10.1029/2001JC000882
- Backhus, D.A., Golini, C., Castellanos, E., 2003. Evaluation of fluorescence quenching for assessing the importance of interactions between nonpolar organic pollutants and dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4717–4723.
- Baken, S., Regelink, I.C., Comans, R.N.J., Smolders, E., Koopmans, G.F., 2016. Iron-rich colloids as carriers of phosphorus in streams: A field-flow fractionation study. *Water Res.* 99, 83–90. doi:10.1016/j.watres.2016.04.060
- Baker, A., Elliott, S., Lead, J.R., 2007. Effects of filtration and pH perturbation on freshwater organic matter fluorescence. *Chemosphere In Press*.
- Baker, A., Inverarity, R., 2004. Protein-like fluorescence intensity as a possible tool for determining river water quality. *Hydrol. Process.* 18, 2927–2945. doi:10.1002/hyp.5597
- Baker, A., Inverarity, R., Charlton, M., Richmond, S., 2003. Detecting river pollution using fluorescence spectrophotometry: case studies from the Ouseburn, NE England. *Environ. Pollut.* 124, 57–70.
- Baker, A., Ward, D., Lieten, S.H., Periera, R., Simpson, E.C., Slater, M., 2004. Measurement of protein-like fluorescence in river and waste water using a handheld spectrophotometer 38, 2934–2938. doi:10.1016/j.watres.2004.04.023
- Baker, a, 2001. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. *Environ. Sci. Technol.* 35, 948–53.
- Balch, J., Guéguen, C., 2015a. Determination of diffusion coefficients of dissolved organic matter in the Churchill River estuary system, Hudson Bay (Canada). *Environ. Chem.*
- Balch, J., Guéguen, C., 2015b. Effects of molecular weight on the diffusion coefficient of aquatic dissolved organic matter and humic substances. *Chemosphere* 119, 498–503. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.013
- Barahona, F., Geiss, O., Urbán, P., Ojea-Jimenez, I., Gilliland, D., Barrero-Moreno, J., 2015. Simultaneous determination of size and quantification of silica nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled to ICPMS using silica nanoparticles standards. *Anal. Chem.* 87, 3039–3047.
- Batchelli, S., Muller, F.L.L., Baalousha, M., Lead, J.R., 2009. Size fractionation and optical properties of colloids in an organic-rich estuary (Thurso, UK). *Mar. Chem.* 113, 227–237. doi:10.1016/j.marchem.2009.02.006
- Bauer, J.E., Bianchi, T.S., 2011. Dissolved organic carbon cycling and transformation. *Treatise Estuar. Coast. Sci.* 5, 7–67.
- Beckett, R., Jue, Z., Giddings, J.C., 1987a. Determination of Molecular Weight Distributions of Fulvic and Humic Acids Using Flow Field-Flow Fractionation. *Environ. Sci. Technol* 21, 289–295.
- Beckett, R., Jue, Z., Giddings, J.C.C., 1987b. Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environ. Sci. Technol* 21, 289–295. doi:10.1021/es00157a010
- Bejarano, A.C., Chandler, G.T., Decho, A.W., 2005. Influence of natural dissolved organic matter (DOM) on acute and chronic toxicity of the pesticides chlorothalonil, chlorpyrifos and fipronil on the meiobenthic estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 321, 43–57. doi:10.1016/j.jembe.2005.01.003
- Benedetti, M., Ranville, J.F.J.F.F., Ponthieu, M., Pinheiro, J.P.J.P., 2002. Field-flow fractionation characterization and binding properties of particulate and colloidal organic matter from the Rio Amazon and Rio Negro. *Org. Geochem.* 33, 269–279. doi:10.1016/S0146-6380(01)00159-0

- Benedetti, M.F., Ranville, J.F., Allard, T., Bednar, A.J., Menguy, N., 2003. The iron status in colloidal matter from the Rio Negro, Brasil. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217, 1–9. doi:10.1016/S0927-7757(02)00553-8
- Benincasa, M.-A., Cartoni, G., Delle Fratte, C., 2002a. Flow field-flow fractionation and characterization of ionic and neutral polysaccharides of vegetable and microbial origin. *J. Chromatogr. A* 967, 219–234.
- Benincasa, M.-A., Cartoni, G., Imperia, N., 2003. HPLC of humic substances fractionated by Flow FFF. *J. Sep. Sci.* 26, 429–432. doi:10.1002/jssc.200390056
- Benincasa, M.-A., Cartoni, G., Imperia, N., 2002b. Effects of ionic strength and electrolyte composition on the aggregation of fractionated humic substances studied by flow field-flow fractionation. *J. Sep. Sci.* 25, 402–415. doi:10.1002/1615-9314(20020501)25:7<405::AID-JSSC405>3.0.CO;2-F
- Benincasa, M.-A., Fratte, C.D., 2004. Influence of ionic strength, sample size, and flow conditions on the retention behavior of pullulan in flow field-flow fractionation. *J. Chromatogr. A* 1046, 175–184. doi:10.1016/j.chroma.2004.06.092
- Benincasa, M.A., 2002. Effects of ionic strength and electrolyte composition on the aggregation of fractionated humic substances studied by flow field-flow fractionation. *J. Sep. Sci.* 25, 402–415.
- Benincasa, M.A., Giddings, J.C., 1992. Separation and molecular weight distribution of anionic and cationic water-soluble polymers by flow field-flow fractionation. *Anal. Chem.* 64, 790–798.
- Benner, E., Pakulski, J.D., McCarthy, M., Hedges, J.I., Hatcher, P.G., 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science (80- )*. 255, 1561–1564.
- Benner, R., 2003. Molecular indicators of the bioavailability of dissolved organic matter. *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter*. Academic Press.
- Benner, R., 2002. Chemical composition and reactivity, in: Hansell, D.A., Carlson, C.A. (Eds.), . Elsevier, Amsterdam, pp. 59–90.
- Benner, R., Amon, R.M.W., 2015. The size-reactivity continuum of major bioelements in the ocean. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7, 185–205. doi:10.1146/annurev-marine-010213-135126
- Benner, R., Biddanda, B., 1998. Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: Effects on bacterial growth. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1373–1378. doi:10.4319/lo.1998.43.6.1373
- Benner, R., Biddanda, B., Black, B., McCarthy, M., 1997. Abundance, size distribution, and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Mar. Chem.* 57, 243–263.
- Benner, R., Kaiser, K., 2011. Biological and photochemical transformations of amino acids and lignin phenols in riverine dissolved organic matter. *Biogeochemistry* 102, 209–222.
- Benner, R., Kaiser, K., Carolina, S., 2003. Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter 48, 118–128.
- Benner, R., Louchouart, P., Amon, R.M.W., 2005. Terrigenous dissolved organic matter in the Arctic Ocean and its transport to surface and deep waters of the North Atlantic. *Global Biogeochem. Cycles* 19, n/a-n/a. doi:10.1029/2004GB002398
- Benner, R., Opsahl, S., 2001. Molecular indicators of the sources and transformations of dissolved organic matter in the Mississippi river plume. *Org. Geochem.* 32, 567–611. doi:10.1016/S0146-6380(00)00197-2
- Benner, R., Peele, E.R., Hodson, R.E., 1986. Microbial utilization of dissolved organic matter from leaves of the red mangrove, *Rhizophora mangle*, in the Fresh Creek estuary, Bahamas. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 23, 607–619.
- Berne, B.J., Pecora, R., 1976. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation.
- Bertilsson, S., Jones, J.B., 2003. Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources. *Aquat. Ecosyst. interactivity dissolved Org. matter* 3–24.
- Bhatia, D., Bourven, I., Simon, S., Bordas, F., Hullebusch, E.D. Van, Rossano, S., Lens, P.N.L., Guibaud, G., van

- Hullebusch, E.D., Rossano, S., Lens, P.N.L., Guibaud, G., 2013. Fluorescence detection to determine proteins and humic-like substances fingerprints of exopolymeric substances (EPS) from biological sludges performed by size exclusion chromatography (SEC). *Bioresour. Technol.* 131, 159–165. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.078
- Bianchi, T.S., 2006. *Biogeochemistry of estuaries*. Oxford University Press.
- Bianchi, T.S., Filley, T., Dria, K., Hatcher, P.G., 2004. Temporal variability in sources of dissolved organic carbon in the lower Mississippi river. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 959–967. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2003.07.011
- Biddanda, B., Benner, R., 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 42, 506–518.
- Bieroza, M., Baker, A., Bridgeman, J., 2011. Classification and calibration of organic matter fluorescence data with multiway analysis methods and artificial neural networks: an operational tool for improved drinking water treatment. *Environmetrics* 22, 256–270. doi:10.1002/env.1045
- Bieroza, M., Baker, A., Bridgeman, J., 2009. Exploratory analysis of excitation-emission matrix fluorescence spectra with self-organizing maps as a basis for determination of organic matter removal efficiency at water treatment works. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 114.
- Bittar, T.B., Berger, S.A., Birsa, L.M., Walters, T.L., Thompson, M.E., Spencer, R.G.M., Mann, E.L., Stubbins, A., Frischer, M.E., Brandes, J.A., 2016. Seasonal dynamics of dissolved, particulate and microbial components of a tidal saltmarsh-dominated estuary under contrasting levels of freshwater discharge. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2016.08.046
- Blough, N.V., Del Vecchio, R., 2002. Chromophoric DOM in the coastal environment, in: Hansell, D.A., Carlson, C.A. (Eds.), . Elsevier, Amsterdam, pp. 509–578.
- Blough, N. V., Zafiriou, O.C., Bonilla, J., 1993. Optical absorption spectra of waters from the Orinoco River outflow: Terrestrial input of colored organic matter to the Caribbean. *J. Geophys. Res.* 98, 2271. doi:10.1029/92JC02763
- Boehme, J., Coble, P., Conmy, R., Stovall-Leonard, A., 2004. Examining CDOM fluorescence variability using principal component analysis: seasonal and regional modeling of three-dimensional fluorescence in the Gulf of Mexico. *Mar. Chem.* 89, 3–14.
- Boehme, J., Wells, M., 2006. Fluorescence variability of marine and terrestrial colloids: Examining size fractions of chromophoric dissolved organic matter in the Damariscotta River estuary. *Mar. Chem.* 101, 95–103. doi:10.1016/j.marchem.2006.02.001
- Boehme, J.R., Coble, P.G., 2000. Characterization of colored dissolved organic matter using high-energy laser fragmentation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3283–3290.
- Boesch, D.F., Boynton, W.R., Crowder, L.B., Diaz, R.J., Howarth, R.W., Mee, L.D., Nixon, S.W., Rabalais, N.N., Rosenberg, R., Sanders, J.G., 2009. Nutrient enrichment drives Gulf of Mexico hypoxia. *Eos, Trans. Am. Geophys. Union* 90, 117–118.
- Bolea, E., Gorriz, M.P.P., Bouby, M., Laborda, F., Castillo, J.R.R., Geckeis, H., 2006. Multielement characterization of metal-humic substances complexation by size exclusion chromatography, asymmetrical flow field-flow fractionation, ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: A comparative approach. *J. Chromatogr. A* 1129, 236–246. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.097
- Bolea, E., Laborda, F., Castillo, J.R., 2010. Metal associations to microparticles, nanocolloids and macromolecules in compost leachates: size characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* 661, 206–14. doi:10.1016/j.aca.2009.12.021
- Borisover, M., Laor, Y., Bukhanovsky, N., Saadi, I., 2006. Fluorescence-based evidence for adsorptive binding of pyrene to effluent dissolved organic matter. *Chemosphere* 65, 1925–1934. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.032
- Borisover, M., Laor, Y., Parparov, A., Bukhanovsky, N., Lado, M., 2009. Spatial and seasonal patterns of fluorescent organic matter in Lake Kinneret (Sea of Galilee) and its catchment basin. *Water Res.* 43, 3104–16. doi:10.1016/j.watres.2009.04.039



- Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuil, M., Blanchoud, H., 2009. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77, 133–139. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.008
- Bottero, J.-Y., Auffan, M., Rose, J., Mouneyrac, C., Botta, C., Labille, J., Masion, A., Thill, A., Chaneac, C., 2011. Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. *Comptes Rendus Geosci.* 343, 168–176.
- Bouby, M., Geckeis, H., Geyer, F.W., 2008. Application of asymmetric flow field-flow fractionation (AsFIFFF) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) to the quantitative characterization of natural colloids and synthetic nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1447–1457. doi:10.1007/s00216-008-2422-0
- Bowers, D.G., Evans, D., Thomas, D.N., Ellis, K., Williams, P.J. I. B., 2004. Interpreting the colour of an estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 59, 13–20. doi:10.1016/j.ecss.2003.06.001
- Boyd, T.J., Osburn, C.L., 2004. Changes in CDOM fluorescence from allochthonous and autochthonous sources during tidal mixing and bacterial degradation in two coastal estuaries. *Mar. Chem.* 89, 189–210.
- Bricaud, A., Morel, A., Prieur, L., 1981. Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains. *Limnol. Ocean.* 26, 43–53.
- Bro, R., 1999. Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multi-way analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 46, 133–147.
- Bro, R., 1997. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38, 149–171.
- Bro, R., Kiers, H.A.L., 2003. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J. Chemom.* 17, 274–286.
- Bronk, D.A., 2002. Dynamics of DON. *Biogeochem. Mar. dissolved Org. matter* 384, p153-247.
- Brooks, M.L., McKnight, D.M., Clements, W.H., 2007. Photochemical control of copper complexation by dissolved organic matter in Rocky Mountain streams, Colorado. *Limnol. Oceanogr.* 52, 766–779. doi:10.4319/lo.2007.52.2.0766
- Brown, W., 1993. *Dynamic light scattering: the method and some applications.* Oxford University Press, USA.
- Buffle, J., 2006. *The Key Role of Environmental Colloids/Nanoparticles for the Sustainability of Life.* Environ. Chem.
- Buffle, J., Leeuwen, H.P. van, 1992. *Environmental particles,* LEWIS PUBL. ed.
- Buffle, J., Leppard, G.G., 1995. Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2169–75. doi:10.1021/es00009a004
- Buffle, J., Wilkinson, K.J., Stoll, S., Filella, M., Zhang, J., 1998. A Generalized Description of Aquatic Colloidal Interactions: The Three-colloidal Component Approach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2887–2899. doi:10.1021/es980217h
- Buffle, J., Wilkinson, K.J., van Leeuwen\*, H.P., 2009. Chemodynamics and bioavailability in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7170–7174.
- Burdige, D.J., 2005. Burial of terrestrial organic matter in marine sediments: A re-assessment. *Global Biogeochem. Cycles* 19, n/a-n/a. doi:10.1029/2004GB002368
- Burdige, D.J., 2001. Dissolved organic matter in Chesapeake Bay sediment pore waters. *Org. Geochem.* 32, 487–505. doi:10.1016/S0146-6380(00)00191-1
- Burdige, D.J., Kline, S.W., Chen, W., 2004. Fluorescent dissolved organic matter in marine sediment pore waters. *Mar. Chem.* 89, 289–311.
- Bushaw, K.L., 1996. Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter. *Nat.* .
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257–267.

- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H., 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ. Pollut.* 157, 64–71.
- Callahan, J., Dai, M., Chen, R.F., Li, X., Lu, Z., Huang, W., 2004. Distribution of dissolved organic matter in the Pearl River Estuary, China. *Mar. Chem.* 89, 211–224.
- Cammack, W.K.L., Kalff, J., Prairie, Y.T., Smith, E.M., 2004. Fluorescent dissolved organic matter in lakes: Relationships with heterotrophic metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 49, 2034–2045.
- Cancino, L., Neves, R., 1999. Hydrodynamic and sediment suspension modelling in estuarine systems: Part II: Application to the Western Scheldt and Gironde estuaries. *J. Mar. Syst.* 22, 117–131.
- Carder, K.L., Steward, R.G., Harvey, G.R., Ortner, P.B., 1989. Marine humic and fulvic acids: Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. *Limnol. Oceanogr.* 34, 68–81.
- Carlson, C.A., Del Giorgio, P.A., Herndl, G.J., 2007. Microbes and the dissipation of energy and respiration: from cells to ecosystems. *Oceanogr. DC-OCEANOGRAPHY Soc.* 20, 89.
- Carstea, E.M., Baker, A., Bierzoza, M., Reynolds, D., 2010. Continuous fluorescence excitation–emission matrix monitoring of river organic matter. *Water Res.* 44, 5356–5366.
- Carstea, E.M., Baker, A., Bierzoza, M., Reynolds, D.M., Bridgeman, J., 2014. Characterisation of dissolved organic matter fluorescence properties by PARAFAC analysis and thermal quenching. *Water Res.* 61, 152–161. doi:10.1016/j.watres.2014.05.013
- Castaing, P., Allen, G.P., 1981. Mechanisms controlling seaward escape of suspended sediment from the Gironde: a macrotidal estuary in France. *Mar. Geol.* 40, 101–118.
- Catalá, T.S., Álvarez-Salgado, X.A., Otero, J., Iuculano, F., Companys, B., Horstkotte, B., Romera-Castillo, C., Nieto-Cid, M., Latasa, M., Morán, X.A.G., 2016. Drivers of fluorescent dissolved organic matter in the global epipelagic ocean. *Limnol. Oceanogr.* 61, 1101–1119.
- Catalá, T.S., Reche, I., Fuentes-Lema, A., Romera-Castillo, C., Nieto-Cid, M., Ortega-Retuerta, E., Calvo, E., Álvarez, M., Marrasé, C., Stedmon, C.A., Álvarez-Salgado, X.A., 2015. Turnover time of fluorescent dissolved organic matter in the dark global ocean. *Nat. Commun.* 6, 5986. doi:10.1038/ncomms6986
- Cawley, K.M., Butler, K.D., Aiken, G.R., Larsen, L.G., Huntington, T.G., McKnight, D.M., 2012. Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1678–87. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.05.040
- Chea, R., Grenouillet, G., Lek, S., 2016. Evidence of Water Quality Degradation in Lower Mekong Basin Revealed by Self-Organizing Map. *PLoS One* 11, e0145527.
- Chen, G., Liu, X., Su, C., 2012. Distinct effects of humic acid on transport and retention of TiO<sub>2</sub> rutile nanoparticles in saturated sand columns. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7142–7150.
- Chen, H., Meng, W., Zheng, B., Wang, C., An, L., 2013. Optical signatures of dissolved organic matter in the watershed of a globally large river (Yangtze River, China). *Limnol. - Ecol. Manag. Int. Waters* 43, 482–491. doi:10.1016/j.limno.2013.04.004
- Chen, H., Zheng, B., Song, Y., Qin, Y., 2010. Correlation between molecular absorption spectral slope ratios and fluorescence humification indices in characterizing CDOM. *Aquat. Sci.* 73, 103–112. doi:10.1007/s00027-010-0164-5
- Chen, J., Gu, B., Leboeuf, E.J.E.J., Pan, H., Dai, S., 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48, 59–68.
- Chen, M., Price, R.M., Yamashita, Y., Jaffé, R., 2010. Comparative study of dissolved organic matter from groundwater and surface water in the Florida coastal Everglades using multi-dimensional spectrofluorometry combined with multivariate statistics. *Appl. Geochemistry* 25, 872–880. doi:10.1016/j.apgeochem.2010.03.005
- Chen, R.F., 1999. In situ fluorescence measurements in coastal waters. *Org. Geochem.* 30, 397–409.
- Chen, W.B., Smith, D.S., Guéguen, C., 2013. Influence of water chemistry and dissolved organic matter (DOM) molecular size on copper and mercury binding determined by multiresponse fluorescence quenching.

- Chevreuil, M., Carru, A.-M., Chesterikoff, A., Boët, P., Tales, E., Allardi, J., 1995. Contamination of fish from different areas of the river Seine (France) by organic (PCB and pesticides) and metallic (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) micropollutants. *Sci. Total Environ.* 162, 31–42. doi:10.1016/0048-9697(95)04335-X
- Chiffolleau, J.-F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, I., Ficht, A., Gonzalez, J.-L., Romana, L.-A., 2001. Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries* 24, 1029–1040.
- Chin, Y.-P., Traina, S.J., Swank, C.R., Backhus, D., 1998. Abundance and properties of dissolved organic matter in pore waters of a freshwater wetland. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1287–1296. doi:10.4319/lo.1998.43.6.1287
- Chin, Y.P., Aiken, G.R., O’Loughlin, E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. ...* 28, 1853–1858. doi:10.1021/es00060a015
- Cho, B.C., Azam, F., 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean’s euphotic zone. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldend.* 63, 253–259.
- Cho, J., Amy, G., Pellegrino, J., 2000. Membrane filtration of natural organic matter: comparison of flux decline, NOM rejection, and foulants during filtration with three UF membranes. *Desalination* 127, 283–298. doi:10.1016/S0011-9164(00)00017-5
- Chow, A.T., Dai, J., Conner, W.H., Hitchcock, D.R., Wang, J.-J., 2013. Dissolved organic matter and nutrient dynamics of a coastal freshwater forested wetland in Winyah Bay, South Carolina. *Biogeochemistry* 112, 571–587. doi:10.1007/s10533-012-9750-z
- Chow, C.W.K., Fabris, R., Leeuwen, J. van, Wang, D., Drikas, M., 2008. Assessing natural organic matter treatability using high performance size exclusion chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6683–6689.
- Citeau, L., Lamy, I., van Oort, F., Elsass, F., 2003. Colloidal facilitated transfer of metals in soils under different land use. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217, 11. doi:10.1016/S0927-7757(02)00554-X
- Coble, P.G., 2007. Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. *Chem. Rev.* 107, 402–418.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51, 325–346.
- Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V., Gagosian, R.B., 1990. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348, 432–435.
- Coble, P.G., Zepp, R., Zika, R., 2004. CDOM in the ocean: transformation processes and their effects on optical properties. *Mar. Chem.* 89, 1.
- Cory, R.M., McKnight, D.M., 2005. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8142–9.
- Couturier, M., Nozais, C., Chaillou, G., 2016. Microtidal subterranean estuaries as a source of fresh terrestrial dissolved organic matter to the coastal ocean. *Mar. Chem.* 186, 46–57.
- Cowie, G.L., Hedges, J.I., 1994. Biochemical indicators of diagenetic alteration in natural organic matter mixtures. *Nature* 369, 304–307.
- Coyne, A., Seyler, P., Etcheber, H., Meybeck, M., Orange, D., 2005. Spatial and seasonal dynamics of total suspended sediment and organic carbon species in the Congo River. *Global Biogeochem. Cycles* 19.
- Cozzarelli, I.M., Böhlke, J.K., Masoner, J., Breit, G.N., Lorah, M.M., Tuttle, M.L.W., Jaeschke, J.B., 2011. Biogeochemical evolution of a landfill leachate plume, Norman, Oklahoma. *Ground Water* 49, 663–687.
- Croué, J.-P., 2004. Isolation of Humic and Non-Humic NOM Fractions: Structural Characterization. *Environ. Monit. Assess.* 92, 193–207. doi:10.1023/B:EMAS.0000039369.66822.c0
- Cruz, J.M., 2015. Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : développement de nouveaux outils et application à l’estuaire de la Gironde.
- Cuss, C.W., Guéguen, C., 2013. Distinguishing dissolved organic matter at its origin: Size and optical properties of leaf-litter leachates. *Chemosphere* 92, 1483–1489. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.062
- Cuss, C.W.W., Guéguen, C., 2015. Relationships between molecular weight and fluorescence properties for size-

- fractionated dissolved organic matter from fresh and aged sources. *Water Res.* 68, 487–497. doi:10.1016/j.watres.2014.10.013
- Cuss, C.W.W., Guéguen, C., 2012. Determination of relative molecular weights of fluorescent components in dissolved organic matter using asymmetrical flow field-flow fractionation and parallel factor analysis. *Anal. Chim. Acta* 733, 98–102. doi:10.1016/j.aca.2012.05.003
- Davis III, S.E., Childers, D.L., Noe, G.B., 2006. The contribution of leaching to the rapid release of nutrients and carbon in the early decay of wetland vegetation. *Hydrobiologia* 569, 87–97.
- De Souza Sierra, M.M., Donard, O.F.X., 1991. Simulation of fluorescence variability in estuaries. *Oceanol. Acta* 11, 275–284.
- De Souza Sierra, M.M., Donard, O.F.X., Lamotte, M., 1997. Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes. *Mar. Chem.* 58, 51–58. doi:10.1016/S0304-4203(97)00025-X
- De Souza Sierra, M.M., Donard, O.F.X., Lamotte, M., Belin, C., Ewald, M., 1994. Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters. *Mar. Chem.* 47, 127–144.
- Degens, E.T., Kempe, S., Richey, J.E., 1991. *SCOPE 42: Biogeochemistry of major world rivers*. UK Wiley.
- Déjardin, P., 2013. Determination of the functioning parameters in asymmetrical flow field-flow fractionation with an exponential channel. *J. Chromatogr. A* 1305, 213–220. doi:10.1016/j.chroma.2013.06.037
- Del Castillo, C.E., Coble, P.G., 2000. Seasonal variability of the colored dissolved organic matter during the 1994–95 NE and SW Monsoons in the Arabian Sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 47, 1563–1579.
- Del Giorgio, P.A., Cole, J.J., 1998. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 503–541.
- Del Giorgio, P.A., Cole, J.J., Cimleris, A., 1997. Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385, 148–151.
- Del Giorgio, P.A., Duarte, C.M., 2002. Respiration in the open ocean. *Nature* 420, 379–384.
- Del Vecchio, R., Blough, N. V., 2004. On the origin of the optical properties of humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3885–91.
- Delay, M., Frimmel, F.H., 2012. Nanoparticles in aquatic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 583–592.
- Deloffre, J., Lafite, R., Lesueur, P., Lesourd, S., Verney, R., Guézennec, L., 2005. Sedimentary processes on an intertidal mudflat in the upper macrotidal Seine estuary, France. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 64, 710–720.
- Deloffre, J., Lafite, R., Lesueur, P., Verney, R., Lesourd, S., Cuvilliez, A., Taylor, J., 2006. Controlling factors of rhythmic sedimentation processes on an intertidal estuarine mudflat—Role of the turbidity maximum in the macrotidal Seine estuary, France. *Mar. Geol.* 235, 151–164.
- Denman, K.L., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., Cox, P.M., Dickinson, R.E., Hauglustaine, D., Heinze, C., Holland, E., Jacob, D., Lohmann, U., Ramachandran, S., da Silva Dias, P., Wofsy, S.C., Zhang, X., 2007. Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin. Cambridge Univ. Press.
- Deonarine, A., Hsu-Kim, H., 2009. Precipitation of mercuric sulfide nanoparticles in NOM-containing water: Implications for the natural environment. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2368–2373.
- Deonarine, A., Lau, B.L.T., Aiken, G.R., Ryan, J.N., Hsu-Kim, H., 2011. Effects of humic substances on precipitation and aggregation of zinc sulfide nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3217–3223.
- Determann, S., Lobbes, J.M., Reuter, R., Rullkotter, J., 1998. Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Mar. Chem.* 62, 137–156.
- DeVilbiss, S.E., Zhou, Z., Klump, J.V., Guo, L., 2016. Spatiotemporal variations in the abundance and composition of bulk and chromophoric dissolved organic matter in seasonally hypoxia-influenced Green Bay, Lake Michigan, USA. *Sci. Total Environ.* 565, 742–757. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.015
- Dhawan, A., Taurozzi, J.S., Pandey, A.K., Shan, W., Miller, S.M., Hashsham, S.A., Tarabara, V. V., 2006. Stable

- colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7394–7401.
- Di, Y., Aminot, Y., Schroeder, D.C., Readman, J.W., Jha, A.N., 2016. Integrated biological responses and tissue-specific expression of p53 and ras genes in marine mussels following exposure to benzo ( $\alpha$ ) pyrene and C60 fullerenes, either alone or in combination. *Mutagenesis* gew049.
- Dignac, M.-F., Ginestet, P., Rybacki, D., Bruchet, A., Urbain, V., Scribe, P., 2000. Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter. *Water Res.* 34, 4185–4194. doi:10.1016/S0043-1354(00)00195-0
- Ding, Y., Teppen, B.J., Boyd, S.A., Li, H., 2013. Measurement of associations of pharmaceuticals with dissolved humic substances using solid phase extraction. *Chemosphere* 91, 314–319.
- Dittmar, T., Cooper, W.T., Koch, B.P., Kattner, G., 2006. How important are intertidal ecosystems for global biogeochemical cycles? Molecular and isotopic evidence for major outwelling of photo-bleached dissolved organic matter from mangroves. *AGU Spring Meet. Abstr.* 1, 1.
- Dittmar, T., Kattner, G., 2003. The biogeochemistry of the river and shelf ecosystem of the Arctic Ocean: a review. *Mar. Chem.* 83, 103–120.
- Dittmar, T., Koch, B.P., 2006. Thermogenic organic matter dissolved in the abyssal ocean. *Mar. Chem.* 102, 208–217.
- Dittmar, T., Lara, R.J., 2001. Molecular evidence for lignin degradation in sulfate-reducing mangrove sediments (Amazonia, Brazil). *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1417–1428.
- Dittmar, T., Paeng, J., 2009. A heat-induced molecular signature in marine dissolved organic matter. *Nat. Geosci.* 2, 175–179. doi:10.1038/ngeo440
- Dittmar, T., Whitehead, K., Minor, E.C., Koch, B.P., 2007. Tracing terrigenous dissolved organic matter and its photochemical decay in the ocean by using liquid chromatography/mass spectrometry. *Mar. Chem.* 107, 378–387. doi:10.1016/j.marchem.2007.04.006
- Dixon, J.L., Osburn, C.L., Paerl, H.W., Peierls, B.L., 2014. Seasonal changes in estuarine dissolved organic matter due to variable flushing time and wind-driven mixing events. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 151, 210–220.
- Domingos, R.F., Tufenkji, N., Wilkinson, K.J., 2009. Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: role of a fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1282–1286.
- Doxaran, D., Froidefond, J.-M., Castaing, P., Babin, M., 2009. Dynamics of the turbidity maximum zone in a macrotidal estuary (the Gironde, France): Observations from field and MODIS satellite data. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 81, 321–332. doi:10.1016/j.ecss.2008.11.013
- Duan, Y.-P., Meng, X.-Z., Wen, Z.-H., Ke, R.-H., Chen, L., 2013. Multi-phase partitioning, ecological risk and fate of acidic pharmaceuticals in a wastewater receiving river: The role of colloids. *Sci. Total Environ.* 447, 267–273.
- Dubascoux, S., 2007. Développement d'une méthode de fractionnement par couplage flux force (FFF) multi-détection pour la caractérisation de colloïdes naturels.
- Dubascoux, S., Heroult, J., Le Hécho, I., Potin-Gautier, M., Lespes, G., 2008. Evaluation of a combined fractionation and speciation approach for study of size-based distribution of organotin species on environmental colloids. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1805–1813. doi:10.1007/s00216-008-1913-3
- Dubascoux, S., Von Der Kammer, F., Le Hécho, I., Gautier, M.P.P., Lespes, G., 2008. Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation. *J. Chromatogr. A* 1206, 160–5. doi:10.1016/j.chroma.2008.07.032
- Durand, A., Laignel, B., 2012. Apports fluviaux latéraux à l'estuaire de Seine (Parts respectives des facteurs naturels et humains de l'érosion).
- Durce, D., Maes, N., Bruggeman, C., Van Ravestyn, L., 2016. Alteration of the molecular-size-distribution of Boom Clay dissolved organic matter induced by Na(+) and Ca(2.). *J. Contam. Hydrol.* 185–186, 14–27. doi:10.1016/j.jconhyd.2015.12.001
- Duursma, E.K., Dawson, R., 1981. *Marine organic chemistry*. Elsevier.

- Dycus, P.J.M., Healy, K.D., Stearman, G.K., Wells, M.J.M., 1995. Diffusion coefficients and molecular weight distributions of humic and fulvic acids determined by flow field-flow fractionation. *Sep. Sci. Technol.* 30, 1435–1453.
- Eichinger, M., Poggiale, J.-C., Sempéré, R., 2011. Toward a mechanistic approach to modeling bacterial DOC pathways: a review. *Microb. carbon pump Ocean. Sci. booklet, Suppl. to Sci.* 66–68.
- Einsiedl, F., Mayer, B., Schäfer, T., 2008. Evidence for incorporation of H<sub>2</sub>S in groundwater fulvic acids from stable isotope ratios and sulfur K-edge X-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2439–2444.
- Ejarque-Gonzalez, E., Butturini, A., 2014. Self-Organising Maps and Correlation Analysis as a Tool to Explore Patterns in Excitation-Emission Matrix Data Sets and to Discriminate Dissolved Organic Matter Fluorescence Components. *PLoS One* 9, e99618.
- El Hadri, H., Gigault, J., Chéry, P., Potin-Gautier, M., Lespes, G., 2014. Optimization of flow field-flow fractionation for the characterization of natural colloids. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1639–1649.
- ElBishlawi, H., Jaffe, P.R., 2015. Characterization of dissolved organic matter from a restored urban marsh and its role in the mobilization of trace metals. *Chemosphere* 127, 144–151.
- Erlandsson, M., Buffam, I., FÖLSTER, J., Laudon, H., Temnerud, J., Weyhenmeyer, G.A., Bishop, K., 2008. Thirty-five years of synchrony in the organic matter concentrations of Swedish rivers explained by variation in flow and sulphate. *Glob. Chang. Biol.* 14, 1191–1198.
- Espinoza, L.A.T., ter Haseborg, E., Weber, M., Frimmel, F.H., 2009. Investigation of the photocatalytic degradation of brown water natural organic matter by size exclusion chromatography. *Appl. Catal. B Environ.* 87, 56–62.
- Etcheber, H., Schmidt, S., Sottolichio, A., Maneux, E., Chabaux, G., Escalier, J.-M., Wennekes, H., Derriennic, H., Schmeltz, M., Quemener, L., 2011. Monitoring water quality in estuarine environments: lessons from the MAGEST monitoring program in the Gironde fluvial-estuarine system. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 15, 831–840.
- Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F., Commarieu, M.-V., 2007. Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: origin and lability. *Hydrobiologia* 588, 245–259. doi:10.1007/s10750-007-0667-9
- Everett, C.R., Chin, Y.-P., Aiken, G. a., 1999. High pressure size exclusion chromatography analysis of dissolved organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Limnol. Oceanogr.* 44, 1316–1322. doi:10.4319/lo.1999.44.5.1316
- Ewald, M., Belin, C., Berger, P., Weber, J.H., 1983. Corrected fluorescence spectra of fulvic acids isolated from soil and water. *Environ. Sci. Technol.* 17, 501–504.
- Fairbridge, R.W., 1980. *The estuary: its definition and geodynamic cycle*, Wiley. ed, Chemistry and biogeochemistry of estuaries.
- Fang, F., Kanan, S., Patterson, H.H., Cronan, C.S., 1998. A spectrofluorimetric study of the binding of carbofuran, carbaryl, and aldicarb with dissolved organic matter. *Anal. Chim. Acta* 373, 139–151.
- Fellman, J.B., D'Amore, D. V., Hood, E., Boone, R.D., 2008. Fluorescence characteristics and biodegradability of dissolved organic matter in forest and wetland soils from coastal temperate watersheds in southeast Alaska. *Biogeochemistry* 88, 169–184. doi:10.1007/s10533-008-9203-x
- Fellman, J.B., Hood, E., Edwards, R.T., D'Amore, D. V., 2009. Changes in the concentration, biodegradability, and fluorescent properties of dissolved organic matter during stormflows in coastal temperate watersheds. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 114, n/a-n/a. doi:10.1029/2008JG000790
- Fellman, J.B., Hood, E., Spencer, R.G.M., 2010. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnol. Oceanogr.* 55, 2452–2462. doi:10.4319/lo.2010.55.6.2452
- Fellman, J.B., Miller, M.P., Cory, R.M., D'Amore, D. V, White, D., 2009. Characterizing dissolved organic matter using PARAFAC modeling of fluorescence spectroscopy: a comparison of two models. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6228–34.

- Fichot, C.G., Benner, R., 2012. The spectral slope coefficient of chromophoric dissolved organic matter (S<sub>275-295</sub>) as a tracer of terrigenous dissolved organic carbon in river-influenced ocean margins. *Limnol. Oceanogr.* 57, 1453–1466. doi:10.4319/lo.2012.57.5.1453
- Fichot, C.G., Benner, R., 2011. *Frontiers | A novel method to estimate DOC concentrations from CDOM absorption coefficients in coastal waters [WWW Document]. Geophys. Res. Lett.* doi:10.1029/2010GL046152
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science (80- )*. 281, 237–240.
- Filella, M., 2009. Freshwaters: which NOM matters? *Environ. Chem. Lett.* 7, 21–35.
- Findlay, S., Quinn, J.M., Hickey, C.W., Burrell, G., Downes, M., 2001. Effects of land use and riparian flowpath on delivery of dissolved organic carbon to streams. *Limnol. Oceanogr.* 46, 345–355.
- Findlay, S., Sinsabaugh, R.L., 2003. *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter.* Academic Press.
- Flaig, W., 1960. Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 4, 49–62.
- Fogg, G.E., 1977. Excretion of organic matter by phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 22, 576–577.
- Fontugne, M.R., Jouanneau, J.M., 1987. Modulation of the particulate organic carbon flux to the ocean by a macrotidal estuary: evidence from measurements of carbon isotopes in organic matter from the Gironde system. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 24, 377–387.
- Franke, D., Hamilton, M.W., Ziegler, S.E., 2012. Variation in the photochemical lability of dissolved organic matter in a large boreal watershed. *Aquat. Sci.* 74, 751–768. doi:10.1007/s00027-012-0258-3
- Frey, K.E., Sobczak, W. V., Mann, P.J., Holmes, R.M., 2016. Optical properties and bioavailability of dissolved organic matter along a flow-path continuum from soil pore waters to the Kolyma River mainstem, East Siberia. *Biogeosciences* 13, 2279. doi:10.5194/bg-13-2279-2016
- Gao, H., Zepp, R.G., 1998. Factors influencing photoreactions of dissolved organic matter in a coastal river of the southeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2940–2946.
- Gardner, G.B., Chen, R.F., Berry, A., 2005. High-resolution measurements of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Neponset River Estuary, Boston Harbor, MA. *Mar. Chem.* 96, 137–154. doi:10.1016/j.marchem.2004.12.006
- Garnier, J., Billen, G., Even, S., Etcheber, H., Servais, P., 2008. Organic matter dynamics and budgets in the turbidity maximum zone of the Seine Estuary (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 77, 150–162. doi:10.1016/j.ecss.2007.09.019
- Garnier, J., Billen, G., Némery, J., Sebilo, M., 2010. Transformations of nutrients (N, P, Si) in the turbidity maximum zone of the Seine estuary and export to the sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 90, 129–141.
- Geckeis, H., Ngo Manh, T.T., Bouby, M., Kim, J.I., 2003. Aquatic colloids relevant to radionuclide migration: characterization by size fractionation and ICP-mass spectrometric detection. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217, 101/108. doi:10.1016/S0927-7757(02)00564-2
- Ghosh, K., Schnitzer, M., 1980. Macromolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 129, 266–276.
- Giddings, J.C., 1993. Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science (80- )*. 260, 1456–1465.
- Giddings, J.C., Yang, F.J., Myers, M.N., 1976. Theoretical and experimental characterization of flow field-flow fractionation. *Anal. Chem.* 48, 1126–1132.
- Gigault, J., Pettibone, J.M., Schmitt, C., Hackley, V.A., 2013. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 809, 9–24. doi:10.1016/j.aca.2013.11.021
- Gigault, J., Zhang, W., Lespes, G., Charleux, B., Grassl, B., 2014. Asymmetrical flow field-flow fractionation analysis of water suspensions of polymer nanofibers synthesized via RAFT-mediated emulsion polymerization. *Anal. Chim. Acta* 819, 116–121. doi:10.1016/j.aca.2014.02.011

- Gimbert, L.J., Andrew, K.N., Haygarth, P.M., Worsfold, P.J.P.J., 2003. Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF). *TrAC Trends Anal. Chem.* 22, 615–633. doi:10.1016/S0165-9936(03)01103-8
- Giraudel, J.L., Lek, S., 2001. A comparison of self-organizing map algorithm and some conventional statistical methods for ecological community ordination. *Ecol. Modell.* 146, 329–339.
- Goni, M.A., Hedges, J., 1995. Sources and reactivities of marine-derived organic matter in coastal sediments as determined by alkaline CuO oxidation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 2965–2981.
- Gonsior, M., Peake, B.M., Cooper, W.T., Podgorski, D., D'Andrilli, J., Cooper, W.J., 2009. Photochemically Induced Changes in Dissolved Organic Matter Identified by Ultrahigh Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 43, 698–703. doi:10.1021/es8022804
- Gonzalez-Rey, M., Tapie, N., Le Menach, K., Dévier, M.-H., Budzinski, H., Bebianno, M.J., 2015. Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Mar. Pollut. Bull.* 96, 384–400.
- Gorham, E., 1991. Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol. Appl.* 1, 182–195.
- Graham, A.M., Aiken, G.R., Gilmour, C.C., 2012. Dissolved organic matter enhances microbial mercury methylation under sulfidic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2715–2723.
- Griffin, C.G., Frey, K.E., Rogan, J., Holmes, R.M., 2011. Spatial and interannual variability of dissolved organic matter in the Kolyma River, East Siberia, observed using satellite imagery. *J. Geophys. Res.* 116, G03018. doi:10.1029/2010JG001634
- Gueguen, C., Belin, C., Dominik, J., 2002. Organic colloid separation in contrasting aquatic environments with tangential flow filtration. *Water Res.* 36, 1677–1684.
- Guéguen, C., Burns, D.C., McDonald, A., Ring, B., 2012. Structural and optical characterization of dissolved organic matter from the lower Athabasca River, Canada. *Chemosphere* 87, 932–937. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.047
- Guéguen, C., Cuss, C.W., 2011. Characterization of aquatic dissolved organic matter by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to UV–Visible diode array and excitation emission matrix fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1218, 4188–98. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.038
- Guéguen, C., Cuss, C.W., Cassels, C.J., Carmack, E.C., 2014. Absorption and fluorescence of dissolved organic matter in the waters of the Canadian Arctic Archipelago, Baffin Bay, and the Labrador Sea. *J. Geophys. Res. Ocean.* 119, 2034–2047. doi:10.1002/2013JC009173
- Guéguen, C., Cuss, C.W., Chen, W., 2013. Asymmetrical flow field-flow fractionation and excitation-emission matrix spectroscopy combined with parallel factor analyses of riverine dissolved organic matter isolated by tangential flow ultrafiltration. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93, 1428–1440. doi:10.1080/03067319.2013.764415
- Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., Guéguen, C., Cuss, C.W., Gueguen, C., 2011. Characterization of aquatic dissolved organic matter by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to UV–Visible diode array and excitation emission matrix fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1218, 4188–4198. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.038
- Guéguen, C., Granskog, M.A.A., McCullough, G., Barber, D.G.G., 2011. Characterisation of colored dissolved organic matter in Hudson Bay and Hudson Strait using parallel factor analysis. *J. Mar. Syst.* 88, 423–433. doi:10.1016/j.jmarsys.2010.12.001
- Guéguen, C., Guo, L., Wang, D., Tanaka, N., Hung, C.-C., 2006. Chemical Characteristics and Origin of Dissolved Organic Matter in the Yukon River. *Biogeochemistry* 77, 139–155. doi:10.1007/s10533-005-0806-1
- Guéguen, C., Guo, L., Yamamoto-Kawai, M., Tanaka, N., 2007. Colored dissolved organic matter dynamics across the shelf-basin interface in the western Arctic Ocean. *J. Geophys. Res.* 112, C05038. doi:10.1029/2006JC003584
- Guéguen, C., Itoh, M., Kikuchi, T., Eert, J., Williams, W.J., 2015. Variability in dissolved organic matter optical properties in surface waters in the Amerasian Basin. *Front. Mar. Sci.* 2. doi:10.3389/fmars.2015.00078



- Guéguen, C., Mokhtar, M., Perroud, A., McCullough, G., Papakyriakou, T., 2016. Mixing and photoreactivity of dissolved organic matter in the Nelson/Hayes estuarine system (Hudson Bay, Canada). *J. Mar. Syst.*
- Guézennec, L., Lafite, R., Dupont, J.-P., Meyer, R., Boust, D., 1999. Hydrodynamics of suspended particulate matter in the tidal freshwater zone of a macrotidal estuary (the Seine estuary, France). *Estuaries* 22, 717–727.
- Guo, J., Peng, Y., Guo, J., Ma, J., Wang, W., Wang, B., 2011. Dissolved organic matter in biologically treated sewage effluent (BTSE): Characteristics and comparison. *Desalination* 278, 365–372.
- Guo, L., Santschi, P.H., 1997. Composition and cycling of colloids in marine environments. *Rev. Geophys.* 35, 17–40.
- Guo, L., Santschi, P.H., 1996. A critical evaluation of the cross-flow ultrafiltration technique for sampling colloidal organic carbon in seawater. *Mar. Chem.* 55, 113–127.
- Guo, W., Stedmon, C. a., Han, Y., Wu, F., Yu, X., Hu, M., 2007. The conservative and non-conservative behavior of chromophoric dissolved organic matter in Chinese estuarine waters. *Mar. Chem.* 107, 357–366. doi:10.1016/j.marchem.2007.03.006
- Guo, W., Xu, J., Wang, J., Wen, Y., Zhuo, J., Yan, Y., 2010. Characterization of dissolved organic matter in urban sewage using excitation emission matrix fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *J. Environ. Sci.* 22, 1728–1734. doi:10.1016/S1001-0742(09)60312-0
- Guo, W., Yang, L., Hong, H., Stedmon, C.A., Wang, F., Xu, J., Xie, Y., 2011. Assessing the dynamics of chromophoric dissolved organic matter in a subtropical estuary using parallel factor analysis. *Mar. Chem.* 124, 125–133. doi:10.1016/j.marchem.2011.01.003
- Guo, X., He, X., Zhang, H., Deng, Y., Chen, L., Jiang, J., 2012. Characterization of dissolved organic matter extracted from fermentation effluent of swine manure slurry using spectroscopic techniques and parallel factor analysis (PARAFAC). *Microchem. J.* 102, 115–122. doi:10.1016/j.microc.2011.12.006
- Håkansson, A., Magnusson, E., Bergenståhl, B., Nilsson, L., 2012. Hydrodynamic radius determination with asymmetrical flow field-flow fractionation using decaying cross-flows. Part I. A theoretical approach. *J. Chromatogr. A* 1253, 120–126. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.029
- Hamzeh, M., Ouddane, B., El-daye, M., Halwani, J., 2013. Profile of trace metals accumulation in core sediment from Seine river estuary (docks basin). *Environ. Technol.* 34, 1107–1116.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., 2014. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., 2001. Marine Dissolved Organic Matter and the Carbon Cycle 14, 41–49.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., 1998. Deep ocean gradients in dissolved organic carbon concentrations. *Nature* 395, 263–266.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., Repeta, D.J., Schlitzer, R., 2009. Dissolved organic matter in the ocean: A controversy stimulates new insights.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., Schlitzer, R., 2012. Net removal of major marine dissolved organic carbon fractions in the subsurface ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 26.
- Hansen, A.M., Kraus, T.E.C., Pellerin, B.A., Fleck, J.A., Downing, B.D., Bergamaschi, B.A., 2016. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. *Limnol. Oceanogr.* 61, 1015–1032. doi:10.1002/lno.10270
- Hartmann, R.L., Williams, S.K.R., 2002. Flow field-flow fractionation as an analytical technique to rapidly quantitate membrane fouling. *J. Memb. Sci.* 209, 93.
- Harvey, H.R., Mannino, A., 2001. The chemical composition and cycling of particulate and macromolecular dissolved organic matter in temperate estuaries as revealed by molecular organic tracers. *Org. Geochem.* 32, 527–542.
- Hassellöv, M., 2005. Relative molar mass distributions of chromophoric colloidal organic matter in coastal seawater determined by Flow Field-Flow Fractionation with UV absorbance and fluorescence detection. *Mar. Chem.* 94, 111–123. doi:10.1016/j.marchem.2004.07.012

- Hassellöv, M., Lyvén, B., Beckett, R., 1999. Sedimentation Field-Flow Fractionation Coupled Online to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry New Possibilities for Studies of Trace Metal Adsorption onto Natural Colloids. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4528–4531. doi:10.1021/es981334f
- Hassellöv, M., von der Kammer, F., Beckett, R., 2007. Characterisation of aquatic colloids and macromolecules by field-flow fractionation. *IUPAC Ser. Anal. Phys. Chem. Environ. Syst.* 10, 223.
- Hassler, C.S., Alasonati, E., Nichols, C.A.M., Slaveykova, V.I., 2011. Exopolysaccharides produced by bacteria isolated from the pelagic Southern Ocean—role in Fe binding, chemical reactivity, and bioavailability. *Mar. Chem.* 123, 88–98.
- Hayase, K., Shinozuka, N., 1995. Vertical distribution of fluorescent organic matter along with AOU and nutrients in the equatorial Central Pacific. *Mar. Chem.* 48, 283–290.
- Hedges, J.I., 1992. Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Mar. Chem.* .
- Hedges, J.I., Cowie, G.L., Richey, J.E., Quay, P.D., Benner, R., Strom, M., Forsberg, B.R., 1994. Origins and processing of organic matter in the Amazon River as indicated by carbohydrates and amino acids. *Limnol. Oceanogr.* 39, 743–761.
- Hedges, J.I., Keil, R.G., Benner, R., 1997. What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Org. Geochem.* 27, 195–212.
- Hedges, J.I., Mann, D.C., 1979. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochim. Cosmochim. Acta* .
- Hedges, R.E.M., 2002. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44, 319–328. doi:10.1111/1475-4754.00064
- Helms, J.R., Mao, J., Schmidt-Rohr, K., Abdulla, H., Mopper, K., 2013a. Photochemical flocculation of terrestrial dissolved organic matter and iron. *Geochim. Cosmochim. Acta* 121, 398–413. doi:10.1016/j.gca.2013.07.025
- Helms, J.R., Stubbins, A., Perdue, E.M., Green, N.W., Chen, H., Mopper, K., 2013b. Photochemical bleaching of oceanic dissolved organic matter and its effect on absorption spectral slope and fluorescence. *Mar. Chem.* 155, 81–91. doi:10.1016/j.marchem.2013.05.015
- Helms, J.R., Stubbins, A., Ritchie, J.D., Minor, E.C., Kieber, D.J., Mopper, K., 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 53, 955–969. doi:10.4319/lo.2008.53.3.0955
- Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S. a, Jefferson, B., 2008. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Res.* 42, 3435–45. doi:10.1016/j.watres.2007.10.032
- Hennebert, P., Avellan, A., Yan, J., Aguerre-Chariol, O., 2013. Experimental evidence of colloids and nanoparticles presence from 25 waste leachates. *Waste Manag.* 33, 1870–81. doi:10.1016/j.wasman.2013.04.014
- Her, N., Amy, G., Foss, D., Cho, J., Yoon, Y., Kosenka, P., 2002. Optimization of method for detecting and characterizing NOM by HPLC-size exclusion chromatography with UV and on-line DOC detection. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1069–76.
- Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y., 2003. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Res.* 37, 4295–4303. doi:10.1016/S0043-1354(03)00317-8
- Herlemann, D.P.R., Manecki, M., Meeske, C., Pollehne, F., Labrenz, M., Schulz-Bull, D., Dittmar, T., Jürgens, K., 2014. Uncoupling of bacterial and terrigenous dissolved organic matter dynamics in decomposition experiments. *PLoS One* 9, e93945.
- Herman, P.M.J., Heip, C.H.R., 1999. Biogeochemistry of the MAXimum TURbidity Zone of Estuaries (MATURE): some conclusions. *J. Mar. Syst.* 22, 89–104.
- Hernes, P.J., Benner, R., 2006. Terrigenous organic matter sources and reactivity in the North Atlantic Ocean and a comparison to the Arctic and Pacific oceans. *Mar. Chem.* 100, 66–79.
- Hernes, P.J., Benner, R., 2003. Photochemical and microbial degradation of dissolved lignin phenols: Implications

- for the fate of terrigenous dissolved organic matter in marine environments. *J. Geophys. Res.* 108, 3291. doi:10.1029/2002JC001421
- Hernes, P.J., Benner, R., 2002. Transport and diagenesis of dissolved and particulate terrigenous organic matter in the North Pacific Ocean. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 49, 2119–2132.
- Herrero, P., Bäuerlein, P.S., Emke, E., Marcé, R.M., de Voogt, P., 2015. Size and concentration determination of (functionalised) fullerenes in surface and sewage water matrices using field flow fractionation coupled to an online accurate mass spectrometer: method development and validation. *Anal. Chim. Acta* 871, 77–84. doi:10.1016/j.aca.2015.02.042
- Hir, P. Le, Ficht, A., Jacinto, R.S., Lesueur, P., Dupont, J.-P., Lafite, R., Brenon, I., Thouvenin, B., Cugier, P., 2001. Fine Sediment Transport and Accumulations at the Mouth of the Seine Estuary (France). *Estuaries* 24, 950. doi:10.2307/1353009
- Hoch, A.R., Reddy, M.M., Aiken, G.R., 2000. Calcite crystal growth inhibition by humic substances with emphasis on hydrophobic acids from the Florida Everglades. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 61–72.
- Holmes, R.M., McClelland, J.W., Peterson, B.J., Tank, S.E., Bulygina, E., Eglinton, T.I., Gordeev, V. V, Gurtovaya, T.Y., Raymond, P.A., Repeta, D.J., 2012. Seasonal and annual fluxes of nutrients and organic matter from large rivers to the Arctic Ocean and surrounding seas. *Estuaries and Coasts* 35, 369–382.
- Hongve, D., Baann, J., Becher, G., Lømo, S., 1996. Characterization of humic substances by means of high-performance size exclusion chromatography. *Environ. Int.* 22, 489–494.
- Hu, C., Muller-Karger, F.E., Zepp, R.G., 2002. Absorbance, absorption coefficient, and apparent quantum yield: A comment on common ambiguity in the use of these optical concepts. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1261–1267.
- Hua, B., Veum, K., Yang, J., Jones, J., Deng, B., 2010. Parallel factor analysis of fluorescence EEM spectra to identify THM precursors in lake waters. *Environ. Monit. Assess.* 161, 71–81. doi:10.1007/s10661-008-0728-1
- Huber, S.A., Balz, A., Abert, M., Pronk, W., 2011. Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography–organic carbon detection–organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Res.* 45, 879–885.
- Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D., 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters—a review. *River Res. Appl.* 23, 631–649. doi:10.1002/rra.1005
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.-M.J.M., Parlanti, E., 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org. Geochem.* 40, 706. doi:10.1016/j.orggeochem.2009.03.002
- Huguet, A., Vacher, L., Saubusse, S., Etcheber, H., Abril, G., Relexans, S., Ibalot, F., Parlanti, E., 2010. New insights into the size distribution of fluorescent dissolved organic matter in estuarine waters. *Org. Geochem.* 41, 595–610. doi:10.1016/j.orggeochem.2010.02.006
- Hulatt, C.J., Thomas, D.N., 2010. Dissolved organic matter (DOM) in microalgal photobioreactors: a potential loss in solar energy conversion? *Bioresour. Technol.* 101, 8690–8697.
- Hulst, H.C., van de Hulst, H.C., 1957. Light scattering by small particles. Courier Corporation.
- Hunt, J.F., Ohno, T., 2007. Characterization of fresh and decomposed dissolved organic matter using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multiway analysis. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2121–8. doi:10.1021/jf063336m
- Hur, J., Park, M.-H., Schlautman, M. a, 2009. Microbial transformation of dissolved leaf litter organic matter and its effects on selected organic matter operational descriptors. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2315–21.
- Hwang, J., Druffel, E.R.M., 2003. Lipid-like material as the source of the uncharacterized organic carbon in the ocean? *Science* (80-. ). 299, 881–884.
- Hyung, H., Kim, J.-H., 2008. Natural organic matter (NOM) adsorption to multi-walled carbon nanotubes: effect of NOM characteristics and water quality parameters. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4416–4421.
- Inamdar, S., Finger, N., Singh, S., Mitchell, M., Levia, D., Bais, H., Scott, D., McHale, P., 2012. Dissolved organic matter (DOM) concentration and quality in a forested mid-Atlantic watershed, USA. *Biogeochemistry* 108, 55–76. doi:10.1007/s10533-011-9572-4

- Jaffé, R., Boyer, J.N., Lu, X., Maie, N., Yang, C., Scully, N.M., Mock, S., 2004. Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove-dominated estuary by fluorescence analysis. *Mar. Chem.* 84, 195–210.
- Jaffé, R., McKnight, D., Maie, N., Cory, R., McDowell, W.H., Campbell, J.L., 2008. Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystems: The importance of long-term monitoring of optical properties. *J. Geophys. Res.* 113, G04032. doi:10.1029/2008JG000683
- Jalón-Rojas, I., Schmidt, S., Sottolichio, A., 2015. Turbidity in the fluvial Gironde Estuary (southwest France) based on 10-year continuous monitoring: Sensitivity to hydrological conditions. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 19, 2805–2819. doi:10.5194/hess-19-2805-2015
- Jiang, F., Lee, F.S.-C., Wang, X., Dai, D., 2008. The application of Excitation/Emission Matrix spectroscopy combined with multivariate analysis for the characterization and source identification of dissolved organic matter in seawater of Bohai Sea, China. *Mar. Chem.* 110, 109–119. doi:10.1016/j.marchem.2008.02.010
- Jiao, N., Herndl, G.J., Hansell, D. a, Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S.W., Kirchman, D.L., Weinbauer, M.G., Luo, T., Chen, F., Azam, F., 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 593–9. doi:10.1038/nrmicro2386
- Jørgensen, L., Stedmon, C. a., Kragh, T., Markager, S., Middelboe, M., Søndergaard, M., 2011. Global trends in the fluorescence characteristics and distribution of marine dissolved organic matter. *Mar. Chem.* 126, 139–148. doi:10.1016/j.marchem.2011.05.002
- Kalle, K., 1949. Fluorescence and contents of yellow substance in the Gulfs of Bothnia and Finland. *Dtsch. Hydrogr. Zeitschrift* 2, 117–124.
- Kammer, F. v. d., Baborowski, M., Friese, K., 2005. Field-flow fractionation coupled to multi-angle laser light scattering detectors: Applicability and analytical benefits for the analysis of environmental colloids. *Anal. Chim. Acta* 552, 166–174. doi:10.1016/j.aca.2005.07.049
- Kammer, F. von der, Legros, S., Hofmann, T., Larsen, E.H., Loeschner, K., 2011. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 425–436. doi:10.1016/j.trac.2010.11.012
- Kan, A.T., Tomson, M.B., 1990. Ground water transport of hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 253–263.
- Kattge, J., Knorr, W., Raddatz, T., Wirth, C., 2009. Quantifying photosynthetic capacity and its relationship to leaf nitrogen content for global-scale terrestrial biosphere models. *Glob. Chang. Biol.* 15, 976–991.
- Kawasaki, N., Matsushige, K., Komatsu, K., Kohzu, A., Nara, F.W., Ogishi, F., Yahata, M., Mikami, H., Goto, T., Imai, A., 2011. Fast and precise method for HPLC–size exclusion chromatography with UV and TOC (NDIR) detection: Importance of multiple detectors to evaluate the characteristics of dissolved organic matter. *Water Res.* 45, 6240–6248. doi:10.1016/j.watres.2011.09.021
- Keith, D.J., Yoder, J.A., Freeman, S.A., 2002. Spatial and temporal distribution of coloured dissolved organic matter (CDOM) in Narragansett Bay, Rhode Island: implications for phytoplankton in coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55, 705–717.
- Keller, D.P., Hood, R.R., 2011. Modeling the seasonal autochthonous sources of dissolved organic carbon and nitrogen in the upper Chesapeake Bay. *Ecol. Modell.* 222, 1139–1162.
- Kellerman, A.M., Dittmar, T., Kothawala, D.N., Tranvik, L.J., 2014. Chemodiversity of dissolved organic matter in lakes driven by climate and hydrology. *Nat. Commun.* 5, 3804. doi:10.1038/ncomms4804
- Kellerman, A.M., Kothawala, D.N., Dittmar, T., Tranvik, L.J., 2015. Persistence of dissolved organic matter in lakes related to its molecular characteristics. *Nat. Geosci.* 8, 454–457. doi:10.1038/ngeo2440
- Kieber, R.J., Zhou, X., Mopper, K., 1990. Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: Fate of riverine carbon in the sea 35.
- Kirchman, D.L., Borch, N.H., 2003. Fluxes of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in the Delaware estuary. *Estuaries* 26, 894–904.
- Kitidis, V., Stubbins, A.P., Uher, G., Goddard, R.C.U., Law, C.S., Woodward, E.M.S., 2006. Variability of

- chromophoric organic matter in surface waters of the Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 53, 1666–1684.
- Klinkhammer, G.P., Manus, J.M., Colbert, D., Rudnicki, M.D., 2000. Behavior of terrestrial dissolved organic matter at the continent-ocean boundary from high-resolution distributions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 2765–2774.
- Knuutinen, J., Virkki, L., Mannila, P., Mikkelsen, P., Paasivirta, J., Herve, S., 1988. High-performance liquid chromatographic study of dissolved organic matter in natural waters. *Water Res.* 22, 985–990. doi:10.1016/0043-1354(88)90145-5
- Koch, B.P., Ludwichowski, K.-U., Kattner, G., Dittmar, T., Witt, M., 2008. Advanced characterization of marine dissolved organic matter by combining reversed-phase liquid chromatography and FT-ICR-MS. *Mar. Chem.* 111, 233–241. doi:10.1016/j.marchem.2008.05.008
- Koch, T., Giddings, J.C., 1986. High-speed separation of large (> 1.  $\mu$  m) particles by steric field-flow fractionation. *Anal. Chem.* 58, 994–997.
- Koffi, E.N., Rayner, P.J., Scholze, M., Beer, C., 2012. Atmospheric constraints on gross primary productivity and net ecosystem productivity: Results from a carbon-cycle data assimilation system. *Global Biogeochem. Cycles* 26.
- Kohonen, T., 2001. *Self-Organizing Maps*, Springer Series in Information Sciences. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-56927-2
- Kong, L., Mukherjee, B., Chan, Y.F., Zepp, R.G., 2013. Quenching and sensitizing fullerene photoreactions by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6189–6196.
- Kothawala, D.N., Ji, X., Laudon, H., Ågren, A.M., Futter, M.N., Köhler, S.J., Tranvik, L.J., 2015. The relative influence of land cover, hydrology, and in-stream processing on the composition of dissolved organic matter in boreal streams. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 120, 1491–1505.
- Kothawala, D.N., von Wachenfeldt, E., Koehler, B., Tranvik, L.J., 2012. Selective loss and preservation of lake water dissolved organic matter fluorescence during long-term dark incubations. *Sci. Total Environ.* 433, 238–46. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.029
- Kowalczyk, P., Cooper, W.J., Durako, M.J., Kahn, A.E., Gonsior, M., Young, H., 2010. Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: Relationships between fluorescence and its components, absorption coefficients and organic carbon concentrations. *Mar. Chem.* 118, 22–36. doi:10.1016/j.marchem.2009.10.002
- Kowalczyk, P., Tilstone, G.H., Zabłocka, M., Röttgers, R., Thomas, R., 2013. Composition of dissolved organic matter along an Atlantic Meridional Transect from fluorescence spectroscopy and Parallel Factor Analysis. *Mar. Chem.* 157, 170–184. doi:10.1016/j.marchem.2013.10.004
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J. Hydrol.* 358, 112–123. doi:10.1016/j.jhydrol.2008.05.030
- Laane, R.W.P.M., Koole, L., 1982. The relation between fluorescence and dissolved organic carbon in the Ems-Dollart estuary and the Western Wadden sea. *Netherlands J. Sea Res.* 15, 217–227.
- Laane, R.W.P.M., Kramer, K.J.M., 1990. Natural fluorescence in the North Sea and its major estuaries. *Netherlands J. Sea Res.* 26, 1–9.
- Labanowski, J., 2004. Matière organique naturelle et anthropique : vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation. <http://epublications.unilim.fr/theses>.
- Lam, B., Baer, A., Alaei, M., Lefebvre, B., Moser, A., Williams, A., Simpson, A., et al., 2007. Major Structural Components in Freshwater Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*
- Lambert, T., Teodoru, C.R., Nyoni, F.C., Bouillon, S., Darchambeau, F., Massicotte, P., Borges, A. V., 2016. Along-stream transport and transformation of dissolved organic matter in a large tropical river. *Biogeosciences* 13, 2727–2741. doi:10.5194/bg-13-2727-2016

- Lanoux, A., 2013. Caractérisation et rôle respectif des apports organiques amont et locaux sur l'oxygénation des eaux de la Garonne estuarienne. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Lapierre, J.-F., Frenette, J.-J., 2009. Effects of macrophytes and terrestrial inputs on fluorescent dissolved organic matter in a large river system. *Aquat. Sci.* 71, 15–24.
- Lara, R.J., Rachold, V., Kattner, G., Hubberten, H.W., Guggenberger, G., Skoog, A., Thomas, D.N., 1998. Dissolved organic matter and nutrients in the Lena River, Siberian Arctic: Characteristics and distribution. *Mar. Chem.* 59, 301–309.
- Lawaetz, A.J., Stedmon, C.A., 2009. Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water. *Appl. Spectrosc.* 63, 936–940.
- Lead, J.R., Wilkinson, K.J., Balnois, E., Cutak, B.J., Larive, C.K., Assemi, S., Beckett, R., 2000a. Diffusion Coefficients and Polydispersities of the Suwannee River Fulvic Acid: Comparison of Fluorescence Correlation Spectroscopy, Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance, and Flow Field-Flow Fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3508–3513. doi:10.1021/es991195h
- Lead, J.R., Wilkinson, K.J., Starchev, K., Canonica, S., Buffle, J., Du, C., Lead, J.R., Wilkinson, K.J., Starchev, K., Canonica, S., Buffle, J., 2000b. Determination of Diffusion Coefficients of Humic Substances by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Role of Solution Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1365–1369.
- Lee, S.T., Yang, B., Kim, J.-Y., Park, J.-H., Moon, M.H., 2015. Combining asymmetrical flow field-flow fractionation with on- and off-line fluorescence detection to examine biodegradation of riverine dissolved and particulate organic matter. *J. Chromatogr. A* 1409, 218–225. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.074
- Leenheer, J.A., 1981. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* 15, 578–587.
- Leenheer, J.A., Croue, J.P., 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, 18A–26A.
- Leenheer, J.A., Noyes, T.I., 1984. A filtration and column-adsorption system for onsite concentration and fractionation of organic substances from large volumes of water. USGPO,.
- Lepane, V., Leeben, A., Malashenko, O., 2004. Characterization of sediment pore-water dissolved organic matter of lakes by high-performance size exclusion chromatography. *Aquat. Sci. - Res. Across Boundaries* 66, 185–194. doi:10.1007/s00027-004-0703-z
- Lesueur, T., Boulangé-Lecomte, C., Restoux, G., Deloffre, J., Xuereb, B., Le Menach, K., Budzinski, H., Petrucciani, N., Marie, S., Petit, F., 2015. Toxicity of sediment-bound pollutants in the Seine estuary, France, using a *Eurytemora affinis* larval bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 169–175.
- Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G. V, Brown Jr, G.E., 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6900–6914.
- Lévesque, M., 1972. FLUORESCENCE AND GEL FILTRATION OF HUMIC COMPOUNDS. *Soil Sci.* 113.
- Li, C., Frohling, S., Harriss, R., 1994. Modeling carbon biogeochemistry in agricultural soils. *Global Biogeochem. Cycles* 8, 237–254.
- Lin, Y.-P., Singer, P.C., Aiken, G.R., 2005. Inhibition of calcite precipitation by natural organic material: kinetics, mechanism, and thermodynamics. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6420–6428.
- Liu, R., Lead, J.R., Baker, A., 2007. Fluorescence characterization of cross flow ultrafiltration derived freshwater colloidal and dissolved organic matter. *Chemosphere* 68, 1304–1311. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.048
- Logan, B.E., Jiang, Q., 1990. Molecular Size Distributions of Dissolved Organic Matter. *J. Environ. Eng.* 116, 1046–1062. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1990)116:6(1046)
- Loh, A.N., Bauer, J.E., Druffel, E.R.M., 2004. Variable ageing and storage of dissolved organic components in the open ocean. *Nature* 430, 877–881. doi:10.1038/nature02780
- Loh, A.N., Canuel, E. a., Bauer, J.E., 2008. Potential source and diagenetic signatures of oceanic dissolved and particulate organic matter as distinguished by lipid biomarker distributions. *Mar. Chem.* 112, 189–202.

doi:10.1016/j.marchem.2008.08.005

- Lovern, S.B., Strickler, J.R., Klaper, R., 2007. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ. Sci. Technol.* 41, 4465–4470.
- Lowry, G. V., Gregory, K.B., Apte, S.C., Lead, J.R., 2012. Transformations of nanomaterials in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6893–6899.
- Lu, X., Jaffe, R., 2001. Interaction between Hg (II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Res.* 35, 1793–1803.
- Lyvén, B., Hassellöv, M., Turner, D.R., Haraldsson, C., Andersson, K., 2003. Competition between iron- and carbon-based colloidal carriers for trace metals in a freshwater assessed using flow field-flow fractionation coupled to ICPMS. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 3791–3802. doi:10.1016/S0016-7037(03)00087-5
- Magnusson, E., Håkansson, A., Janiak, J., Bergenståhl, B., Nilsson, L., Magnusson, E., Bergenståhl, B., Nilsson, L., 2012. Hydrodynamic radius determination with asymmetrical flow field-flow fractionation using decaying cross-flows. Part II. Experimental evaluation. *J. Chromatogr. A* 1253, 120–126. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.005
- Mague, T.H., Friberg, E., Hughes, D.J., Morris, I., 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach. *Limnol. Oceanogr.* 25, 262–279. doi:10.4319/LO.1980.25.2.0262
- Maie, N., Boyer, J.N., Yang, C., Jaffé, R., 2006a. Spatial, geomorphological, and seasonal variability of CDOM in estuaries of the Florida Coastal Everglades. *Hydrobiologia* 569, 135–150. doi:10.1007/s10750-006-0128-x
- Maie, N., Jaffé, R., Miyoshi, T., Childers, D.L., 2006b. Quantitative and Qualitative Aspects of Dissolved Organic Carbon Leached from Senescent Plants in an Oligotrophic Wetland. *Biogeochemistry* 78, 285–314. doi:10.1007/s10533-005-4329-6
- Maie, N., Scully, N.M., Pisani, O., Jaffe, R., 2007. Composition of a protein-like fluorophore of dissolved organic matter in coastal wetland and estuarine ecosystems. *Water Res.* 41, 563–570.
- Maie, N., Sekiguchi, S., Watanabe, A., Tsutsuki, K., Yamashita, Y., Melling, L., Cawley, K.M., Shima, E., Jaffe, R., 2014. Dissolved organic matter dynamics in the oligo/meso-haline zone of wetland-influenced coastal rivers. *J. SEA Res.* 91, 58–69. doi:10.1016/j.seares.2014.02.016
- Maie, N., Yamashita, Y., Cory, R.M., Boyer, J.N., Jaffé, R., 2012. Application of excitation emission matrix fluorescence monitoring in the assessment of spatial and seasonal drivers of dissolved organic matter composition: Sources and physical disturbance controls. *Appl. Geochemistry* 27, 917–929. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.12.021
- Malcolm, R.L., 1990. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Anal. Chim. Acta* 232, 19–30.
- Malik, M.I., Pasch, H., 2016. Field-Flow Fractionation: New and Exciting Perspectives in Polymer Analysis. *Prog. Polym. Sci.*
- Mangal, V., Guéguen, C., 2015. Examining concentrations and molecular weights of thiols in microorganism cultures and in Churchill River (Manitoba) using a fluorescent-labeling method coupled to asymmetrical flow field-flow fractionation. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 4305–4313. doi:10.1007/s00216-015-8599-0
- Maoz, A., Chefetz, B., 2010. Sorption of the pharmaceuticals carbamazepine and naproxen to dissolved organic matter: role of structural fractions. *Water Res.* 44, 981–989. doi:10.1016/j.watres.2009.10.019
- Markager, S., Stedmon, C. a., Søndergaard, M., 2011. Seasonal dynamics and conservative mixing of dissolved organic matter in the temperate eutrophic estuary Horsens Fjord. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 92, 376–388. doi:10.1016/j.ecss.2011.01.014
- Martin, M., Feuillebois, F., 2003. Onset of sample concentration effects on retention in field-flow fractionation. *J. Sep. Sci.* 26, 471–479. doi:10.1002/jssc.200390063
- Mashayekhi, H., Ghosh, S., Du, P., Xing, B., 2012. Effect of natural organic matter on aggregation behavior of C 60 fullerene in water. *J. Colloid Interface Sci.* 374, 111–117.
- Massicotte, P., Frenette, J.-J., 2011. Spatial connectivity in a large river system: resolving the sources and fate of

- dissolved organic matter. *Ecol. Appl.* 21, 2600–17.
- Matilainen, A., 2007. Anu Matilainen Removal of the Natural Organic Matter in the Different Stages of the Drinking Water Treatment Process Removal of the Natural Organic Matter in the Different Stages of the Drinking Water Treatment Process.
- Matilainen, A., Gjessing, E.T., Lahtinen, T., Hed, L., Bhatnagar, A., Sillanpää, M., 2011. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* 83, 1431–1442. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.018
- Mattsson, T., Kortelainen, P., Laubel, A., Evans, D., Pujo-Pay, M., Räike, A., Conan, P., 2009. Export of dissolved organic matter in relation to land use along a European climatic gradient. *Sci. Total Environ.* 407, 1967–1976. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.014
- Mayer, L.M., Schick, L.L., Skorko, K., Boss, E., 2006. Photodissolution of particulate organic matter from sediments. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1064–1071. doi:10.4319/lo.2006.51.2.1064
- McCarthy, J.F., Zachara, J.M., 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 23, 496–502.
- McKnight, D., Thurman, E.M., Wershaw, R.L., Hemond, H., 1985. Biogeochemistry of aquatic humic substances in Thoreau's Bog, Concord, Massachusetts. *Ecology* 66, 1339–1352.
- McKnight, D.M., Aiken, G.R., 1998. Sources and Age of Aquatic Humus. Springer Berlin Heidelberg, pp. 9–39. doi:10.1007/978-3-662-03736-2\_2
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46, 38–48. doi:10.4319/lo.2001.46.1.0038
- McKnight, D.M., Wershaw, R.L., Bencala, K.E., Zellweger, G.W., Feder, G.L., 1992. Humic substances and trace metals associated with Fe and Al oxides deposited in an acidic mountain stream. *Sci. Total Environ.* 117, 485–498.
- Medeiros, P.M., Seidel, M., Ward, N.D., Carpenter, E.J., Gomes, H.R., Niggemann, J., Krusche, A. V., Richey, J.E., Yager, P.L., Dittmar, T., 2015. Fate of the Amazon River dissolved organic matter in the tropical Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 29, 677–690.
- Meng, F., Huang, G., Yang, X., Li, Z., Li, J., Cao, J., Wang, Z., Sun, L., 2013. Identifying the sources and fate of anthropogenically impacted dissolved organic matter (DOM) in urbanized rivers. *Water Res.* 47, 5027–39. doi:10.1016/j.watres.2013.05.043
- Meng, Z., Hashmi, S.M., Elimelech, M., 2013. Aggregation rate and fractal dimension of fullerene nanoparticles via simultaneous multiangle static and dynamic light scattering measurement. *J. Colloid Interface Sci.* 392, 27–33. doi:10.1016/j.jcis.2012.09.088
- Messaud, F.A., Sanderson, R.D., Runyon, J.R., Otte, T., Pasch, H., Williams, S.K.R., 2009. An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Prog. Polym. Sci.* 34, 351–368. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.11.001
- Meybeck, M., 2003. Global occurrence of major elements in rivers. *Treatise on geochemistry* 5, 207–223.
- Meybeck, M., Vörösmarty, C., 1999. Global transfer of carbon by rivers. *Glob. Chang. Newsl.* 37, 18–19.
- Mikes, D., Verney, R., Lafite, R., Belorgey, M., 2004. Controlling factors in estuarine flocculation processes: experimental results with material from the Seine Estuary, Northwestern France. *J. Coast. Res.* 82–89.
- Miller, C.L., Mason, R.P., Gilmour, C.C., Heyes, A., 2007. Influence of dissolved organic matter on the complexation of mercury under sulfidic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 624–633.
- Miller, M.P., Simone, B.E., McKnight, D.M., Cory, R.M., Williams, M.W., Boyer, E.W., 2010. New light on a dark subject: comment. *Aquat. Sci.* 72, 269–275.
- Miller, W.L., Moran, M.A., 1997. Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1317–1324.
- Miller, W.L., Zepp, R.G., 1995. Photochemical production of dissolved inorganic carbon from terrestrial organic matter: significance to the oceanic organic carbon cycle. *Geophys. Res. Lett.* .



- Minero, C., Lauri, V., Falletti, G., Maurino, V., Pelizzetti, E., Vione, D., 2007. Spectrophotometric Characterisation of Surface Lakewater Samples: Implications for the Quantification of Nitrate and the Properties of Dissolved Organic Matter. *Ann. Chim.* 97, 1107–1116.
- Minor, E.C., Simjouw, J.P., Boon, J.J., Kerkhoff, A.E., van der Horst, J., 2002. Estuarine/marine UDOM as characterized by size-exclusion chromatography and organic mass spectrometry. *Mar. Chem.* 78, 75–102.
- Mobed, J.J., Hemmingsen, S.L., Autry, J.L., Mcgown, L.B., 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3061–3065.
- Moon, J., Kimb, S.H., Cho, J., Kim, S.-H., Cho, J., Kimb, S.H., Cho, J., 2006. Characterizations of natural organic matter as nano particle using flow field-flow fractionation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 287, 232–236. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.05.046
- Moore, B., Edie, E.S., Whitley, E., Dakin, W.J., 1912. The Nutrition and Metabolism of Marine Animals in relationship to (a) Dissolved and (b) Particulate Organic Matter of Sea-Water. *Biochem. J.* 6, 255.
- Mopper, K., Kieber, D.J., 2002. Photochemistry and the cycling of carbon, sulfur, nitrogen and phosphorus, in: Hansell, D.A., Carlson, C.A. (Eds.), . Elsevier, Amsterdam, pp. 455–508.
- Mopper, K., Kieber, D.J., Stubbins, A., Hansell, D., Carlson, C., 2015. Marine photochemistry of organic matter: processes and impacts. *Biogeochem. Mar. dissolved Org. matter* 2.
- Mopper, K., Schultz, C.A., 1993. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Mar. Chem.* 41, 229–238.
- Moquin, A., Neibert, K.D., Winnik, F.M., Maysinger, D., 2014. Chapitre 4. Relating the Chemical and Biological Identity of Quantum Dots in N9 Microglia Cells Through Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Analyses. *Points quantiques caractérisation Appl. en Sci. Pharm.* 113.
- Moran, M.A., Covert, J.S., 2003. Photochemically mediated linkages between dissolved organic matter and bacterioplankton. *Aquat. Ecosyst. interactivity dissolved Org. matter* 243–262.
- Moran, M.A., Sheldon W.M, J., Zepp, R.G., 2000. Carbon loss and optical property changes during long-term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1254–1264.
- Moran, M.A., Zepp, R.G., 1997. Invited Review Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Oceanography* 42.
- Mostofa, K.G.M.G., Wu, F., Liu, C.-Q., Fang, W.L., Yuan, J., Ying, W.L., Wen, L., Yi, M., 2010. Characterization of Nanming River (southwestern China) sewerage-impacted pollution using an excitation-emission matrix and PARAFAC. *Limnology* 11, 217–231. doi:10.1007/s10201-009-0306-4
- Mostofa, K.M.G., Liu, C., Mottaleb, M.A., Wan, G., Ogawa, H., Vione, D., Yoshioka, T., Wu, F., 2013. Dissolved organic matter in natural waters, in: *Photobiogeochemistry of Organic Matter*. Springer, pp. 1–137.
- Mostofa, K.M.G., Yoshioka, T., Konohira, E., Tanoue, E., 2007. Photodegradation of fluorescent dissolved organic matter in river waters. *Geochem. J.* 41, 323–331.
- Müller, M.B., Schmitt, D., Frimmel, F.H., 2000. Fractionation of natural organic matter by size exclusion chromatography – Properties and stability of fractions. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4867–4872.
- Munoz, G., Giraudel, J.-L., Botta, F., Lestremau, F., Dévier, M.-H., Budzinski, H., Labadie, P., 2015. Spatial distribution and partitioning behavior of selected poly- and perfluoroalkyl substances in freshwater ecosystems: a French nationwide survey. *Sci. Total Environ.* 517, 48–56. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.043
- Münster, U., 1999. Amino acid profiling in natural organic matter isolated by reverse osmosis from eight different boreal freshwaters. *Environ. Int.* 25, 209–224.
- Münster, U., Chróst, R.J., 1990. Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter, in: *Aquatic Microbial Ecology*. Springer, pp. 8–46.
- Murphy, K.R., Butler, K.D., Spencer, R.G.M., Stedmon, C.A., Boehme, J.R., Aiken, G.R., 2010. Measurement of dissolved organic matter fluorescence in aquatic environments: an interlaboratory comparison. *Environ. Sci. Technol.* 44, 9405–12. doi:10.1021/es102362t

- Murphy, K.R., Hambly, A., Singh, S., Henderson, R.K., Baker, A., Stuetz, R., Khan, S.J., 2011. Organic matter fluorescence in municipal water recycling schemes: toward a unified PARAFAC model. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2909–16. doi:10.1021/es103015e
- Murphy, K.R., Stedmon, C.A., Waite, T.D., Ruiz, G.M., 2008. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 108, 40–58. doi:10.1016/j.marchem.2007.10.003
- Murphy, K.R., Stedmon, C. a., Graeber, D., Bro, R., 2013. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Anal. Methods* 5, 6557. doi:10.1039/c3ay41160e
- Myklestad, S.M., 2000. Dissolved Organic Carbon from Phytoplankton. *Mar. Chem.* 111–148. doi:10.1007/10683826\_5
- Natter, M., Keevan, J., Wang, Y., Keimowitz, A.R., Okeke, B.C., Son, A., Lee, M.-K., 2012. Level and degradation of Deepwater Horizon spilled oil in coastal marsh sediments and pore-water. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5744–5755.
- Neale, P.A., Antony, A., Gernjak, W., Leslie, G., Escher, B.I., 2011. Natural versus wastewater derived dissolved organic carbon: Implications for the environmental fate of organic micropollutants. *Water Res.* 45, 4227–4237.
- Neale, P.J., Kieber, D.J., 2000. Assessing biological and chemical effects of UV in the marine environment: Spectral weighting functions. *Issues Environ. Sci. Technol.* 14, 61–84.
- Nebbioso, A., Piccolo, A., 2013. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 109–124. doi:10.1007/s00216-012-6363-2
- Neubauer, E., Kammerer, F.V.D., Hofmann, T., 2011. Influence of carrier solution ionic strength and injected sample load on retention and recovery of natural nanoparticles using Flow Field-Flow Fractionation. *J. Chromatogr. A* 1218, 6763–73. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.010
- Nguyen, P.T., Lopez, C., Bonnot, C., Varrault, G., Benedetti, M., Cordier, M.-A., Gelibert, A., Cordier, L., Tharaud, M., Parlanti, E., 2013. Study of the Optical Properties of Dissolved Organic Matter in the Seine River Catchment (France), in: *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment*. Springer, pp. 219–223.
- Nie, Z., Wu, X., Huang, H., Fang, X., Xu, C., Wu, J., Liang, X., Shi, J., 2016. Tracking fluorescent dissolved organic matter in multistage rivers using EEM-PARAFAC analysis: implications of the secondary tributary remediation for watershed management. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8756–8769.
- Niederer, C., Schwarzenbach, R.P., Goss, K.-U., 2007. Elucidating differences in the sorption properties of 10 humic and fulvic acids for polar and nonpolar organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6711–6717.
- Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X.A., Pérez, F.F., Pe, F.F., 2006. Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system 51, 1391–1400.
- Nilsson, L., 2013. Separation and characterization of food macromolecules using field-flow fractionation: A review. *Food Hydrocoll.* 30, 1. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.04.007
- Nyquist, G., 1979. Investigation of some optical properties of seawater with special reference to lignin sulfonates and humic substances [Swedish coastal waters, Baltic Sea].
- O’Loughlin, E., Chin, Y.P., 2001. Effect of detector wavelength on the determination of the molecular weight of humic substances by high-pressure size exclusion chromatography. *Water Res.* 35, 333–338. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00228-1
- Oesterreich, T., Klaus, U., Volk, M., Neidhart, B., Spiteller, M., 1999. Environmental fate of amitrole: influence of dissolved organic matter. *Chemosphere* 38, 379–392.
- Ogawa, H., Tanoue, E., Studies, E., Ogawa, H., Tanoue, E., 2003. Dissolved Organic Matter in Oceanic Waters. *J. Oceanogr.* 59, 129–147. doi:10.1023/A:1025528919771
- Ogura, N., 1974. Molecular weight fractionation of dissolved organic matter in coastal seawater by ultrafiltration. *Mar. Biol.* 24, 305–312. doi:10.1007/BF00396097
- Ohno, T., 2002. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved

- organic matter. *Env. Sci Technol.* 36, 742–746.
- Opsahl, S., Benner, R., 1997. Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean. *Nature* 386, 480–482.
- Osburn, C.L., Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Bianchi, T.S., Coffin, R.B., Paerl, H.W., 2016. Optical Proxies for Terrestrial Dissolved Organic Matter in Estuaries and Coastal Waters. *Front. Mar. Sci.* 2, 127.
- Osburn, C.L., Morris, D.P., Thorn, K.A., Moeller, R.E., 2001. Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biogeochemistry* 54, 251–278.
- Owen, D.M., Amy, G.L., Chowdhury, Z.K., Paode, R., McCoy, G., Viscosil, K., 1995. NOM: characterization and treatability: Natural organic matter. *Journal-American Water Work. Assoc.* 87, 46–63.
- Pakulski, J.D., Benner, R., 1994. Abundance and distribution of carbohydrates in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 39, 930–940.
- Pan, B., Liu, Y., Xiao, D., Wu, F., Wu, M., Zhang, D., Xing, B., 2012. Quantitative identification of dynamic and static quenching of ofloxacin by dissolved organic matter using temperature-dependent kinetic approach. *Environ. Pollut.* 161, 192–198.
- Parlanti, E., Belin, C., Texier, H., Ewald, M., Lamotte, M., 1997. Interpretation of the fluorescence signature of the marine and continental waters in the Gironde and Seine estuaries, in: Drozd, J., Gonet, S.S., Senesi, N., Weber, J. (Eds.), . pp. 603–609.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Org. Geochem.* 31, 1765–1781.
- Patel-Sorrentino, N., Mounier, S., Lucas, Y., Benaim, J.Y., 2004. Effects of UV-visible irradiation on natural organic matter from the Amazon basin. *Sci. Total Environ.* 321, 231–239.
- Pelekani, C., Newcombe, G., Snoeyink, V.L., Hepplewhite, C., Assemi, S., Beckett, R., 1999. Characterization of natural organic matter using high performance size exclusion chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2807–2813.
- Peña, A., Rodríguez-Liébana, J.A., Mingorance, M.D., 2011. Persistence of two neonicotinoid insecticides in wastewater, and in aqueous solutions of surfactants and dissolved organic matter. *Chemosphere* 84, 464–470.
- Perdue, E.M., Ritchie, J.D., 2003. Dissolved organic matter in freshwaters, in: Drever, J.I. (Ed.), *Treatise on Geochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, pp. 273–318.
- Pérez, M. a. P.P., Moreira-Turcq, P., Gallard, H., Allard, T., Benedetti, M.F., 2011. Dissolved organic matter dynamic in the Amazon basin: sorption by mineral surfaces. *Chem. Geol.* 286, 158–168. doi:10.1016/j.chemgeo.2011.05.004
- Peuravuori, J., Pihlaja, K., 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal. Chim. Acta* 337, 133–149. doi:10.1016/S0003-2670(96)00412-6
- Philippe, A., Schaumann, G.E., 2014. Interactions of Dissolved Organic Matter with Natural and Engineered Inorganic Colloids: A Review.
- Pifer, A.D., Fairey, J.L., 2012. Improving on SUVA<sub>254</sub> using fluorescence-PARAFAC analysis and asymmetric flow-field flow fractionation for assessing disinfection byproduct formation and control. *Water Res.* 46, 2927–2936. doi:10.1016/j.watres.2012.03.002
- Pifer, A.D., Miskin, D.R., Cousins, S.L., Fairey, J.L., 2011. Coupling asymmetric flow-field flow fractionation and fluorescence parallel factor analysis reveals stratification of dissolved organic matter in a drinking water reservoir. *J. Chromatogr. A* 1218, 4167–4178. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.039
- Poda, A.R., Bednar, A.J., Kennedy, A.J., Harmon, A., Hull, M., Mitrano, D.M., Ranville, J.F., Steevens, J., 2011. Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 4219–4225.
- Prestel, H., Schott, L., Niessner, R., Panne, U., 2005. Characterization of sewage plant hydrocolloids using asymmetrical flow field-flow fractionation and ICP-mass spectrometry. *Water Res.* 39, 3541.

doi:10.1016/j.watres.2005.06.027

- Puddu, A., Zoppini, A., Fazi, S., Rosati, M., Amalfitano, S., Magaletti, E., 2003. Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 257–268.
- Qin, X., Liu, F., Wang, G., Weng, L., 2012. Simultaneous analysis of small organic acids and humic acids using high performance size exclusion chromatography. *J. Sep. Sci.* 35, 3455–3460.
- Ratanathanawongs Williams, S.K.K., Benincasa, M.-A., Ashames, A.A., 2000. Field Flow Fractionation in Analysis of Polymers and Rubbers. *Encycl. Anal. Chem.* 7582–7608.
- Repeta, D.J., Quan, T.M., Aluwihare, L.I., Accardi, A., Hole, W., Repeta, D.J., Quan, T.M., Aluwihare, L.I., Accardi, A., 2002. Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 955–962.
- Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Michelini, E., Roda, A., Roda, O., Roda, A., Roda, O., 2005. Field-flow fractionation and biotechnology. *Biotechnology* 23, 475–483. doi:10.1016/j.tibtech.2005.07.008
- Retamal, L., Vincent, W.F., Martineau, C., Osburn, C.L., 2007. Comparison of the optical properties of dissolved organic matter in two river-influenced coastal regions of the Canadian Arctic. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 72, 261–272. doi:10.1016/j.ecss.2006.10.022
- Réveill  , V., Mansuy, L., Jard  ,  ., Garnier-Sillam,  ., 2003. Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. *Org. Geochem.* 34, 615–627. doi:10.1016/S0146-6380(02)00216-4
- Richey, J.E., Melack, J.M., Aufdenkampe, A.K., Ballester, V.M., Hess, L.L., 2002. Outgassing from Amazonian rivers and wetlands as a large tropical source of atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature* 416, 617–620.
- Riedel, T., Biester, H., Dittmar, T., 2012. Molecular fractionation of dissolved organic matter with metal salts. *Environ. Sci. Technol.* 46, 4419–26. doi:10.1021/es203901u
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. ., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268–1287. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.059
- Rochelle-Newall, E.J., Chu, V.T., Pringault, O., Amouroux, D., Arfi, R., Bettarel, Y., Bouvier, T., Bouvier, C., Got, P., Nguyen, T.M.H., 2011. Phytoplankton distribution and productivity in a highly turbid, tropical coastal system (Bach Dang Estuary, Vietnam). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2317–2329.
- Romera-Castillo, C., Álvarez-Salgado, X.A., Gal  , M., Gasol, J.M., Marras  , C., 2013. Combined effect of light exposure and microbial activity on distinct dissolved organic matter pools. A seasonal field study in an oligotrophic coastal system (Blanes Bay, NW Mediterranean). *Mar. Chem.* 148, 44–51. doi:10.1016/j.marchem.2012.10.004
- Romera-castillo, C., Chen, M., Yamashita, Y., Jaffe, R., 2014. Fluorescence characteristics of size-fractionated dissolved organic matter: Implications for a molecular assembly based structure? 5. doi:10.1016/j.watres.2014.02.017
- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Álvarez-Salgado, X.A., Gasol, J.M., Marras  , C., 2011. Net production and consumption of fluorescent colored dissolved organic matter by natural bacterial assemblages growing on marine phytoplankton exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7490–7498.
- Rosario-Ortiz, F.L., Snyder, S. a, Suffet, I.H., 2007. Characterization of dissolved organic matter in drinking water sources impacted by multiple tributaries. *Water Res.* 41, 4115–28. doi:10.1016/j.watres.2007.05.045
- Sánchez-González, J., García-Otero, N., Moreda-Pi  neiro, A., Bermejo-barrera, P., 2012. Multi-walled carbon nanotubes — Solid phase extraction for isolating marine dissolved organic matter before characterization by size exclusion chromatography. *Microchem. J.* 102, 75–82. doi:10.1016/j.microc.2011.12.001
- Sanchez, N.P., Skeriotis, A.T., Miller, C.M., 2013. Assessment of dissolved organic matter fluorescence PARAFAC components before and after coagulation-filtration in a full scale water treatment plant. *Water Res.* 47, 1679–90. doi:10.1016/j.watres.2012.12.032
- Santos, E.B.H., Duarte, A.C., 1998. The influence of pulp and paper mill effluents on the composition of the humic fraction of aquatic organic matter. *Wat. Res.* 32, 597–608.
- Santos, E.B.H., Filipe, O., Duarte, R.M.B.O., Pinto, H., Duarte, A.C., 2001. Fluorescence as a tool for tracing the

- organic contamination from pulp mill effluents in surface waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 28, 364–371.
- Santos, I.R., Burnett, W.C., Dittmar, T., Suryaputra, I.G.N.A., Chanton, J., 2009. Tidal pumping drives nutrient and dissolved organic matter dynamics in a Gulf of Mexico subterranean estuary. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, 1325–1339.
- Santschi, P.H., Guo, L., Means, J.C., Ravichandran, M., 1999. Natural organic matter binding of trace metals and trace organic contaminants in estuaries. *Biogeochem. Gulf Mex. Estuaries* 347–380.
- Santschi, P.H., Lenhart, J.J., Honeyman, B.D., 1997. Heterogeneous processes affecting trace contaminant distribution in estuaries: The role of natural organic matter. *Mar. Chem.* 58, 99–125.
- Schäfer, A.I., Mauch, R., Waite, T.D., Fane, A.G., 2002. Charge Effects in the Fractionation of Natural Organics Using Ultrafiltration. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2572–2580. doi:10.1021/es0016708
- Schäfer, J., Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Maneux, E., Etcheber, H., 2002. Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.* 79, 229–242.
- Schartup, A.T., Ndu, U., Balcom, P.H., Mason, R.P., Sunderland, E.M., 2015. Contrasting effects of marine and terrestrially derived dissolved organic matter on mercury speciation and bioavailability in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5965–5972.
- Schimpf, M.E., Caldwell, K., Giddings, J.C., 2000. *Field-flow fractionation handbook*. John Wiley & Sons.
- Schimpf, M.E., Petteys, M.P., 1997. Characterization of humic materials by flow field-flow fractionation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 120, 87–100.
- Schimpf, M.E., Wahlund, K., 1997. Asymmetrical flow field-flow fractionation as a method to study the behavior of humic acids in solution. *J. Microcolumn Sep.* 9, 535–543.
- Schmidt, B., Loeschner, K., Hadrup, N., Mortensen, A., Sloth, J.J., Bender Koch, C., Larsen, E.H., 2011. Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Field-Flow Fractionation Coupled Online with Light Scattering Detection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 83, 2461–2468. doi:10.1021/ac102545e
- Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Schulten, H.-R., Kettrup, A., 1998. Structural changes in a dissolved soil humic acid during photochemical degradation processes under O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2531–2541.
- Schnitzer, M., Khan, S.U., 1972. Humic substances in the environment, in: Dekker, M. (Ed.), . New-York, pp. 191–197.
- Schnitzler, J.G., Thomé, J.P., Lepage, M., Das, K., 2011. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Sci. Total Environ.* 409, 3680–3686.
- Schulten, H.R., Schnitzer, M., 1997. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.* 162, 115–130.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M., 2005. *Environmental organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- Schwede-Thomas, S.B., Chin, Y.-P., Dria, K.J., Hatcher, P., Kaiser, E., Sulzberger, B., 2005. Characterizing the properties of dissolved organic matter isolated by XAD and C-18 solid phase extraction and ultrafiltration. *Aquat. Sci.* 67, 61–71. doi:10.1007/s00027-004-0735-4
- Sebestyen, S.D., Boyer, E.W., Shanley, J.B., Kendall, C., Doctor, D.H., Aiken, G.R., Ohte, N., 2008. Sources, transformations, and hydrological processes that control stream nitrate and dissolved organic matter concentrations during snowmelt in an upland forest. *Water Resour. Res.* 44.
- Seidel, M., Yager, P.L., Ward, N.D., Carpenter, E.J., Gomes, H.R., Krusche, A. V., Richey, J.E., Dittmar, T., Medeiros, P.M., 2015. Molecular-level changes of dissolved organic matter along the Amazon River-to-ocean continuum. *Mar. Chem.* 177, 218–231. doi:10.1016/j.marchem.2015.06.019
- Semenov, V.M., Tulina, A.S., Semenova, N.A., Ivannikova, L.A., 2013. Humification and nonhumification pathways of the organic matter stabilization in soil: a review. *Eurasian Soil Sci.* 46, 355–368.

- Sempéré, R., Yoro, S.C., Van Wambeke, F., Charrière, B., 2000. Microbial decomposition of large organic particles in the northwestern Mediterranean Sea: an experimental approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 198, 61–72.
- Senesi, N., 1993. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter. Molecular and mechanistic aspects, in: *Migration and Fate of Pollutants in Soils and Subsoils*. Springer, pp. 47–74.
- Senesi, N., 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part I. The electron spin resonance approach. *Anal. Chim. Acta* 232, 77–106.
- Senesi, N., Miano, N.T., Provenzano, M.R., Brunetti, G., 1991. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152, 259–271.
- Servais, P., Garnier, J., 2006. Organic carbon and bacterial heterotrophic activity in the maximum turbidity zone of the Seine estuary (France). *Aquat. Sci.* 68, 78–85.
- Settimio, L., McLaughlin, M.J., Kirby, J.K., Langdon, K.A., Janik, L., Smith, S., 2015. Complexation of silver and dissolved organic matter in soil water extracts. *Environ. Pollut.* 199, 174–184.
- Sharma, S.K., Maeng, S.K., Nam, S.-N., Amy, G., 2011. 3.15 – Characterization Tools for Differentiating Natural Organic Matter from Effluent Organic Matter, in: *Treatise on Water Science*. pp. 417–427. doi:10.1016/B978-0-444-53199-5.00068-3
- Sharp, J.H., Carlson, C. a, Peltzer, E.T., Castle-Ward, D.M., Savidge, K.B., Rinker, K.R., 2002. Final dissolved organic carbon broad community intercalibration and preliminary use of DOC reference materials. *Mar. Chem.* 77, 239–253. doi:10.1016/S0304-4203(02)00002-6
- Shi, Y.X., Mangal, V., Guéguen, C., 2016. Influence of dissolved organic matter on dissolved vanadium speciation in the Churchill River estuary (Manitoba, Canada). *Chemosphere* 154, 367–374. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.124
- Sholkovitz, E.R., 1976. Flocculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40, 831–845.
- Sholkovitz, E.R., Boyle, E.A., Price, N.B., 1978. The removal of dissolved humic acids and iron during estuarine mixing. *Earth Planet. Sci. Lett.* 40, 130–136.
- Shon, H.-K., Kim, S.-H., Erdei, L., Vigneswaran, S., 2006. Analytical methods of size distribution for organic matter in water and wastewater. *Korean J. Chem. Eng.* 23, 581–591. doi:10.1007/BF02706798
- Shutova, Y., Baker, A., Bridgeman, J., Henderson, R.K., 2014. Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths. *Water Res.* 54, 159–169.
- Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J.J., 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58, 715–733. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.038
- Sigg, L., Behra, P., Stumm, W., 2014. *Chimie des milieux aquatiques-5e édition: Cours et exercices corrigés*. Dunod.
- Sigg, L., Stumm, W., Behra, P., 2000. *Chimie des milieux aquatiques*. Chim. des milieux Nat.
- Simjouw, J.-P., Minor, E.C., Mopper, K., 2005. Isolation and characterization of estuarine dissolved organic matter: Comparison of ultrafiltration and C18 solid-phase extraction techniques. *Mar. Chem.* 96, 219–235.
- Singh, S., D'Sa, E.J., Swenson, E.M., 2010. Chromophoric dissolved organic matter (CDOM) variability in Barataria Basin using excitation-emission matrix (EEM) fluorescence and parallel factor analysis (PARAFAC). *Sci. Total Environ.* 408, 3211–22. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.044
- Skoog, A., Wedborg, M., Fogelqvist, E., 1996. Photobleaching of fluorescence and the organic carbon concentration in a coastal environment. *Mar. Chem.* 55, 333–345.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. *Principes d'analyse instrumentale*. De Boeck Supérieur.
- Sleighter, R.L., Liu, Z., Xue, J., Hatcher, P.G., 2010. Multivariate statistical approaches for the characterization of dissolved organic matter analyzed by ultrahigh resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7576–7582.

- Søndergaard, M., Thomas, D.N., 2004. Dissolved organic matter (DOM) in aquatic ecosystems. A study Eur. catchments Coast. waters, DOMAINE Proj.
- Sottolichio, A., Castaing, P., 1999. A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. IIA - Earth Planet. Sci.* 329, 795–800. doi:10.1016/S1251-8050(00)88634-6
- Spencer, R.G.M., Ahad, J.M.E., Baker, A., Cowie, G.L., Ganeshram, R., Upstill-Goddard, R.C., Uher, G., 2007a. The estuarine mixing behaviour of peatland derived dissolved organic carbon and its relationship to chromophoric dissolved organic matter in two North Sea estuaries (U.K.). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 131–144. doi:10.1016/j.ecss.2007.03.032
- Spencer, R.G.M., Aiken, G.R., Butler, K.D., Dornblaser, M.M., Striegl, R.G., Hernes, P.J., 2009. Utilizing chromophoric dissolved organic matter measurements to derive export and reactivity of dissolved organic carbon exported to the Arctic Ocean: A case study of the Yukon River, Alaska. *Geophys. Res. Lett.* 36, L06401. doi:10.1029/2008GL036831
- Spencer, R.G.M., Bolton, L., Baker, A., Press, A.I.N., 2007b. Freeze/thaw and pH effects on freshwater dissolved organic matter fluorescence and absorbance properties from a number of UK locations. *Water Res.* 41, 2941–2950. doi:10.1016/j.watres.2007.04.012
- Spencer, R.G.M., Butler, K.D., Aiken, G.R., 2012. Dissolved organic carbon and chromophoric dissolved organic matter properties of rivers in the USA. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 117.
- Spencer, R.G.M., Stubbins, A., Hernes, P.J., Baker, A., Mopper, K., Aufdenkampe, A.K., Dyda, R.Y., Mwamba, V.L., Mangangu, A.M., Wabakanghanzi, J.N., 2009. Photochemical degradation of dissolved organic matter and dissolved lignin phenols from the Congo River. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 114.
- Stankus, D.P., Lohse, S.E., Hutchison, J.E., Nason, J.A., 2010. Interactions between natural organic matter and gold nanoparticles stabilized with different organic capping agents. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3238–3244.
- Stedmon, C.A., Amon, R.M.W., Rinehart, A.J., Walker, S.A., 2011. The supply and characteristics of colored dissolved organic matter (CDOM) in the Arctic Ocean: Pan Arctic trends and differences. *Mar. Chem.* 124, 108–118. doi:10.1016/j.marchem.2010.12.007
- Stedmon, C.A., Bro, R., 2008. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnol. Ocean. Methods* 6, 572–579.
- Stedmon, C.A., Markager, S., 2005. Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1415.
- Stedmon, C.A., Markager, S., 2003. Behaviour of the optical properties of coloured dissolved organic matter under conservative mixing. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 57, 973–979.
- Stedmon, C.A., Markager, S., Bro, R., 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 82, 239–254. doi:10.1016/S0304-4203(03)00072-0
- Stedmon, C.A., Markager, S., Kaas, H., 2000. Optical Properties and Signatures of Chromophoric Dissolved Organic Matter (CDOM) in Danish Coastal Waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 267–278. doi:10.1006/ecss.2000.0645
- Stedmon, C.A., Thomas, D.N., Granskog, M., Kaartokallio, H., Papadimitriou, S., Kuosa, H., 2007. Characteristics of dissolved organic matter in Baltic coastal sea ice: allochthonous or autochthonous origins? *Environ. Sci. Technol.* 41, 7273–7279. doi:10.1021/es071210f
- Stedmon, C., Markager, S., Søndergaard, M., Vang, T., Laubel, A., Borch, N., Windelin, A., 2006. Dissolved organic matter (DOM) export to a temperate estuary: seasonal variations and implications of land use. *Estuaries and Coasts* 29, 388–400. doi:10.1007/BF02784988
- Stenson, A.C., Marshall, A.G., Cooper, W.T., 2003. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. *Anal. Chem.* 75, 1275–1284.
- Stevenson, F.J., 1999. *Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients.* John Wiley & Sons.
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry.* Wiley, New York.

- Stolpe, B., Guo, L., Shiller, A.M., Aiken, G.R., 2013. Abundance, size distributions and trace-element binding of organic and iron-rich nanocolloids in Alaskan rivers, as revealed by field-flow fractionation and ICP-MS. *Geochim. Cosmochim. Acta* 105, 221–239. doi:10.1016/j.gca.2012.11.018
- Stolpe, B., Guo, L., Shiller, A.M., Hassellöv, M., 2010a. Size and composition of colloidal organic matter and trace elements in the Mississippi River, Pearl River and the northern Gulf of Mexico, as characterized by flow field-flow fractionation. *Mar. Chem.* 118, 119–128. doi:10.1016/j.marchem.2009.11.007
- Stolpe, B., Hassellöv, M., Andersson, K., Turner, D.R., 2005. High resolution ICPMS as an on-line detector for flow field-flow fractionation; multi-element determination of colloidal size distributions in a natural water sample. *Anal. Chim. Acta* 535, 109–121. doi:10.1016/j.aca.2004.11.067
- Stolpe, B., Hassellöv, M., Hassello, M., 2010b. Nanofibrils and other colloidal biopolymers binding trace elements in coastal seawater: significance for variations in element size distributions. *Limnol. Oceanogr.* 55, 187.
- Stolpe, B., Zhou, Z., Guo, L., Shiller, A.M., 2014. Colloidal size distribution of humic- and protein-like fluorescent organic matter in the northern Gulf of Mexico. *Mar. Chem.* 164, 25–37. doi:10.1016/j.marchem.2014.05.007
- Stubbins, A., Hood, E., Raymond, P. a., Aiken, G.R., Sleighter, R.L., Hernes, P.J., Butman, D., Hatcher, P.G., Striegl, R.G., Schuster, P., Abdulla, H. a. N., Vermilyea, A.W., Scott, D.T., Spencer, R.G.M., 2012. Anthropogenic aerosols as a source of ancient dissolved organic matter in glaciers. *Nat. Geosci.* 5, 198–201. doi:10.1038/ngeo1403
- Stubbins, A., Hubbard, V., Uher, G., Law, C.S., Upstill-Goddard, R.C., Aiken, G.R., Mopper, K., 2008. Relating carbon monoxide photoproduction to dissolved organic matter functionality. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3271–3276.
- Suryaputra, I.G.N.A., Santos, I.R., Huettel, M., Burnett, W.C., Dittmar, T., 2015. Non-conservative behavior of fluorescent dissolved organic matter (FDOM) within a subterranean estuary. *Cont. Shelf Res.* 110, 183–190.
- Sutton, R., Sposito, G., 2005. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9009–9015. doi:10.1021/es050778q
- Swietlik, J., Sikorska, E., 2006. Characterization of natural organic matter fractions by high pressure size-exclusion chromatography, specific UV absorbance and total luminescence spectroscopy. *Polish J. Environ. Stud.* 15, 145.
- Tadanier, C.J., Berry, D.F., Knocke, W.R., 2000. Dissolved Organic Matter Apparent Molecular Weight Distribution and Number-Average Apparent Molecular Weight by Batch Ultrafiltration. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2348–2353. doi:10.1021/es9907966
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q.T., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* 393, 84–95.
- Tank, J.L., Rosi-Marshall, E.J., Griffiths, N.A., Entekin, S.A., Stephen, M.L., 2010. A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29, 118–146.
- Thang, N.M.N.M., Geckeis, H., Kim, J.I.I., Beck, H.P.P., 2001. Application of the flow field flow fractionation (FFFF) to the characterization of aquatic humic colloids: evaluation and optimization of the method. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 181, 289–301. doi:10.1016/S0927-7757(00)00803-7
- Thio, B.J.R., Zhou, D., Keller, A.A., 2011. Influence of natural organic matter on the aggregation and deposition of titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 189, 556–563.
- Thomsen, M., Dobel, S., Lassen, P., Carlsen, L., Bügel Mogensen, B., Erik Hansen, P., 2002. Reverse quantitative structure-activity relationship for modelling the sorption of esfenvalerate to dissolved organic matter: A multivariate approach. *Chemosphere* 49, 1317–1325.
- Thorn, K.A., Kennedy, K.R., 2002. <sup>15</sup>N NMR investigation of the covalent binding of reduced TNT amines to soil humic acid, model compounds, and lignocellulose. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3787–3796.
- Thorn, K.A., Mikita, M.A., 1992. Ammonia fixation by humic substances: a nitrogen-15 and carbon-13 NMR study. *Sci. Total Environ.* 113, 67–87.
- Thurman, E.M., 1985. Humic substances in groundwater, in: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L.,



- MacCarthy, P. (Eds.), . John Wiley and Sons, pp. 87–103.
- Thurman, E.M., 1985. Amino acids, in: *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Springer, pp. 151–180.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 15, 463–466. doi:10.1021/es00086a012
- Togola, A., Budzinski, H., 2007a. Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79, 6734–6741.
- Togola, A., Budzinski, H., 2007b. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC–MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 627–635.
- Touron, A., Berthe, T., Gargala, G., Fournier, M., Ratajczak, M., Servais, P., Petit, F., 2007. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1441–1450.
- Tremblay, L.B., Dittmar, T., Marshall, A.G., Cooper, W.J., Cooper, W.T., 2007. Molecular characterization of dissolved organic matter in a North Brazilian mangrove porewater and mangrove-fringed estuaries by ultrahigh resolution Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry and excitation/emission spectroscopy. *Mar. Chem.* 105, 15–29. doi:10.1016/j.marchem.2006.12.015
- Twardowski, M.S., Boss, E., Sullivan, J.M., Donaghay, P.L., 2004. Modeling the spectral shape of absorption by chromophoric dissolved organic matter. *Mar. Chem.* 89, 69–88.
- Tzortziou, M., Osburn, C.L., Neale, P.J., 2007. Photobleaching of dissolved organic material from a tidal marsh-estuarine system of the Chesapeake Bay. *Photochem. Photobiol.* 83, 782–792.
- Uher, G., Hughes, C., Henry, G., Upstill-Goddard, R.C., 2001. Non-conservative mixing behavior of colored dissolved organic matter in a humic-rich, turbid estuary. *Geophys. Res. Lett.* 28, 3309–3312.
- Ulrich, A., Losert, S., Bendixen, N., Al-Kattan, A., Hagendorfer, H., Nowack, B., Adlhart, C., Ebert, J., Lattuada, M., Hungerbühler, K., 2012. Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. *J. Anal. At. Spectrom.* 27, 1120. doi:10.1039/c2ja30024a
- Urban, N.R., Ernst, K., Bernasconi, S., 1999. Addition of sulfur to organic matter during early diagenesis of lake sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 837–853.
- Vacher, L., 2004. Etude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens. Cas de estuaires de la Gironde et de la Seine.
- Vahatalo, A.V., Wetzel, R.G., 2004. Photochemical and microbial decomposition of chromophoric dissolved organic matter during long (months-years) exposures. *Mar. Chem.* 89, 313–326.
- Vazquez, E., Amalfitano, S., Fazi, S., Butturini, A., 2010. Dissolved organic matter composition in a fragmented Mediterranean fluvial system under severe drought conditions. *Biogeochemistry* 102, 59–72. doi:10.1007/s10533-010-9421-x
- Vepsäläinen, M., Ghiasvand, M., Selin, J., Pienimaa, J., Repo, E., Pulliainen, M., Sillanpää, M., 2009. Investigations of the effects of temperature and initial sample pH on natural organic matter (NOM) removal with electrocoagulation using response surface method (RSM). *Sep. Purif. Technol.* 69, 255–261.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Vernet, M., De Mora, S.J., Demers, S., 2000. *The effects of UV radiation in the marine environment* [electronic resource]. Cambridge University Press.
- Verney, R., Brun-Cottan, J.-C., Lafite, R., Deloffre, J., Taylor, J.A., 2006. Tidally-induced shear stress variability above intertidal mudflats in the macrotidal Seine Estuary. *Estuaries and coasts* 29, 653–664.
- Verney, R., Lafite, R., Brun-Cottan, J.-C., 2009. Flocculation Potential of Estuarine Particles: The Importance of Environmental Factors and of the Spatial and Seasonal Variability of Suspended Particulate Matter. *Estuaries and Coasts* 32, 678–693. doi:10.1007/s12237-009-9160-1

- Veyssey, E., 1998. Transferts de matières organiques des bassins versants aux estuaires de la Gironde et de l'Adour (Sud-Ouest de la France).
- Vodacek, A., Blough, N.V., DeGrandpre, M.D., Peltzer, E.T., Nelson, R.K., 1997. Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: Terrestrial inputs and photooxidation. *Limnol. Oceanogr.* 42, 674–686.
- Vodacek, A., Hoge, F.E., Swift, R.N., Yungel, J.K., Peltzer, E.T., Blough, N.V., Society, A., Vodacek, A., Hoge, F.E., Swift, R.N., Yungel, J.K., Peltzer, E.T., Blough, N.V., 1995. The use of in situ and airborne fluorescence measurements to determine UV absorption coefficients and DOC concentrations in surface waters. *Limnol. Ocean.* 40, 411–415.
- von Wachenfeldt, E., Tranvik, L.J., 2008. Sedimentation in boreal lakes - The role of flocculation of allochthonous dissolved organic matter in the water column. *Ecosystems* 11, 803–814. doi:10.1007/s10021-008-9162-z
- Wada, S., Aoki, M.N., Tsuchiya, Y., Sato, T., Shinagawa, H., Hama, T., 2007. Quantitative and qualitative analyses of dissolved organic matter released from *Ecklonia cava* Kjellman, in Oura Bay, Shimoda, Izu Peninsula, Japan. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 349, 344–358. doi:10.1016/j.jembe.2007.05.024
- Wagner, M., Holzschuh, S., Traeger, A., Fahr, A., Schubert, U.S., 2014a. Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine. *Anal. Chem.* 86, 5201–5210.
- Wagner, M., Pietsch, C., Tauhardt, L., Schallon, A., Schubert, U.S., 2014b. Characterization of cationic polymers by asymmetric flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering—a comparison with traditional techniques. *J. Chromatogr. A* 1325, 195–203.
- Wahlund, K.-G., 2014. Improved terminology for experimental field-flow fractionation. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1579–83. doi:10.1007/s00216-013-7347-6
- Wahlund, K.-G., 2013. Flow field-flow fractionation: Critical overview. *J. Chromatogr. A* 1287, 97–112. doi:10.1016/j.chroma.2013.02.028
- Wahlund, K.G., Giddings, C., Giddings, J.C., 1987. Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Anal. Chem.* 59, 1332–1339. doi:10.1021/ac00136a016
- Wakeham, S.G., Hedges, J.I., Lee, C., Peterson, M.L., Hernes, P.J., 1997. Compositions and transport of lipid biomarkers through the water column and surficial sediments of the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 44, 2131–2162.
- Wakeham, S.G., Lee, C., 1989. Organic geochemistry of particulate matter in the ocean: The role of particles in oceanic sedimentary cycles. *Org. Geochem.* 14, 83–96.
- Walker, S.A., Amon, R.M.W., Stedmon, C.A., 2013. Variations in high-latitude riverine fluorescent dissolved organic matter: A comparison of large Arctic rivers. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 118, 1689–1702.
- Walker, S.A., Amon, R.M.W., Stedmon, C., Duan, S., Louchouart, P., 2009. The use of PARAFAC modeling to trace terrestrial dissolved organic matter and fingerprint water masses in coastal Canadian Arctic surface waters. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 114.
- Walling, D.E., 1983. The sediment delivery problem. *J. Hydrol.* 65, 209–237.
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2006. Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater. *Environ. Geochem. Health* 28, 197–214. doi:10.1007/s10653-005-9032-y
- Wang, X.-C., Chen, R.F., Gardner, G.B., 2004. Sources and transport of dissolved and particulate organic carbon in the Mississippi River estuary and adjacent coastal waters of the northern Gulf of Mexico. *Mar. Chem.* 89, 241–256.
- Wang, Y., Zhang, D., Shen, Z., Chen, J., Feng, C., 2014. Characterization and spacial distribution variability of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Yangtze Estuary. *Chemosphere* 95, 353–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.044
- Wang, Z.-G., Liu, W.-Q., Zhao, N.-J., Li, H.-B., Zhang, Y.-J., Si-Ma, W.-C., Liu, J.-G., 2007. Composition analysis of colored dissolved organic matter in Taihu Lake based on three dimension excitation-emission fluorescence matrix and PARAFAC model, and the potential application in water quality monitoring. *J. Environ. Sci. (China)* 19, 787–91.
- Ward, N.D., Keil, R.G., Medeiros, P.M., Brito, D.C., Cunha, A.C., Dittmar, T., Yager, P.L., Krusche, A. V, Richey, J.E.,

2013. Degradation of terrestrially derived macromolecules in the Amazon River. *Nat. Geosci* 6, 530–533.
- Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B. a, Fram, M.S., Fujii, R., Mopper, K., 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4702–8.
- Wells, M.L., 2004. The colloidal size spectrum of CDOM in the coastal region of the Mississippi Plume using flow field-flow fractionation. *Mar. Chem.* 89, 89–102. doi:10.1016/j.marchem.2004.02.009
- Wells, M.L., 2002. Marine colloids and trace metals. *Biogeochem. Mar. dissolved Org. matter* 367–404.
- Wetzel, R.G., Hatcher, P.G., Bianchi, T.S., 1995. Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1369–1380. doi:10.4319/lo.1995.40.8.1369
- Wilkinson, K.J., Joz-roland, A., Bufjee, J., 1997. Different roles of pedogenic fulvic acids and aquagenic biopolymers on colloid aggregation and stability in freshwaters 42.
- Williams, P.J. le B., 1998. The balance of plankton respiration and photosynthesis in the open oceans. *Nature* 394, 55–57.
- Williams, P.J. le B., del Giorgio, P.A., 2005. Respiration in aquatic ecosystems: history and background. *Respir. Aquat. Ecosyst.* Oxford Univ. Press. Oxford 1–17.
- Woods, G.C., Simpson, M.J., Kelleher, B.P., McCaul, M., Kingery, W.L., Simpson, A.J.A.J., 2009. Online high-performance size exclusion chromatography– nuclear magnetic resonance for the characterization of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 44, 624–630.
- Worms, I.A.M., Al-Gorani Szigeti, Z., Dubascoux, S., Lespes, G., Traber, J., Sigg, L., Slaveykova, V.I., 2010. Colloidal organic matter from wastewater treatment plant effluents: Characterization and role in metal distribution. *Water Res.* 44, 340–50. doi:10.1016/j.watres.2009.09.037
- Worrall, F., Burt, T., Shedden, R., 2003. Long term records of riverine dissolved organic matter. *Biogeochemistry* 64, 165–178. doi:10.1023/A:1024924216148
- Wyatt, P.J., 1993. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* 272, 1–40.
- Ya, C., Anderson, W., Jaffé, R., 2015. Assessing dissolved organic matter dynamics and source strengths in a subtropical estuary: Application of stable carbon isotopes and optical properties. *Cont. Shelf Res.* 92, 98–107.
- Yamashita, Y., Boyer, J.N., Jaffé, R., 2013. Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy. *Cont. Shelf Res.* 66, 136–144. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2013.06.010
- Yamashita, Y., Jaffé, R., 2008. Characterizing the interactions between trace metals and dissolved organic matter using excitation-emission matrix and parallel factor analysis. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7374–9.
- Yamashita, Y., Jaffe, R., Jaffé, R., Maie, N., Tanoue, E., 2008. Assessing the dynamics of dissolved organic matter ( DOM ) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis ( EEM-PARAFAC ). *Limnol. Oceanogr.* 53, 1900–1908. doi:10.4319/lo.2008.53.5.1900
- Yamashita, Y., Kloeppel, B.D., Knoepp, J., Zausen, G.L., Jaffé, R., Jaffe, R., 2011. Effects of Watershed History on Dissolved Organic Matter Characteristics in Headwater Streams. *Ecosystems* 14, 1110–1122. doi:10.1007/s10021-011-9469-z
- Yamashita, Y., Scinto, L.J., Maie, N., Jaffé, R., 2010. Dissolved Organic Matter Characteristics Across a Subtropical Wetland's Landscape: Application of Optical Properties in the Assessment of Environmental Dynamics. *Ecosystems* 13, 1006–1019. doi:10.1007/s10021-010-9370-1
- Yamashita, Y., Tanoue, E., 2004. Chemical characteristics of amino acid-containing dissolved organic matter in seawater. *Org. Geochem.* 35, 679–692.
- Yamashita, Y., Tanoue, E., 2004. In situ production of chromophoric dissolved organic matter in coastal environments. *Geophys. Res. Lett.* 31.

- Yamashita, Y., Tanoue, E., 2003. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Mar. Chem.* 82, 255–271.
- Yang, L., Chen, C.-T.A., Hong, H., Chang, Y.-C., Lui, H.-K., 2015. Mixing behavior and bioavailability of dissolved organic matter in two contrasting subterranean estuaries as revealed by fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 166, 161–169.
- Yang, L., Guo, W., Hong, H., Wang, G., 2013. Non-conservative behaviors of chromophoric dissolved organic matter in a turbid estuary: Roles of multiple biogeochemical processes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 133, 285–292. doi:10.1016/j.ecss.2013.09.007
- Yasui, S., Kanda, J., Usui, T., Ogawa, H., 2016. Seasonal variations of dissolved organic matter and nutrients in sediment pore water in the inner part of Tokyo Bay. *J. Oceanogr.* 1–16. doi:10.1007/s10872-016-0382-0
- Yohannes, G., Wiedmer, S.K.K., Jussila, M., Riekkola, M.L.M.-L., 2005. Fractionation of Humic Substances by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Chromatographia* 61, 359–364. doi:10.1365/s10337-005-0510-2
- Yoshioka, T., Mostofa, K.M.G., Konohira, E., Tanoue, E., Hayakawa, K., Takahashi, M., Ueda, S., Katsuyama, M., Khodzher, T., Bashenkhaeva, N., Korovyakova, I., Sorokovikova, L., Gorbunova, L., 2007. Distribution and characteristics of molecular size fractions of freshwater-dissolved organic matter in watershed environments: its implication to degradation. *Limnology* 8, 29–44. doi:10.1007/s10201-006-0194-9
- You, S.-J.S.-J., Yin, Y., Allen, H.E.H.E., 1999. Partitioning of organic matter in soils: effects of pH and water/soil ratio. *Sci. Total Environ.* 227, 155–160. doi:10.1016/S0048-9697(99)00024-8
- Yu, H., Liang, H., Qu, F., Han, Z., Shao, S., Chang, H., Li, G., 2015. Impact of dataset diversity on accuracy and sensitivity of parallel factor analysis model of dissolved organic matter fluorescence excitation-emission matrix. *Sci. Rep.* 5.
- Yu, H., Song, Y., Gao, H., Liu, L., Yao, L., Peng, J., 2015. Applying fluorescence spectroscopy and multivariable analysis to characterize structural composition of dissolved organic matter and its correlation with water quality in an urban river. *Environ. Earth Sci.* 73, 5163–5171.
- Yu, H., Song, Y., Tu, X., Du, E., Liu, R., Peng, J., 2013. Assessing removal efficiency of dissolved organic matter in wastewater treatment using fluorescence excitation emission matrices with parallel factor analysis and second derivative synchronous fluorescence. *Bioresour. Technol.* 144, 595–601.
- Zanardi-Lamardo, E., 2004. Seasonal variation in molecular mass and optical properties of chromophoric dissolved organic material in coastal waters of southwest Florida. *Mar. Chem.* 89, 37–54.
- Zanardi-Lamardo, E., Clark, C.D., Moore, C.A., Zika, R.G., 2002. Comparison of the molecular mass and optical properties of colored dissolved organic material in two rivers and coastal waters by flow field-flow fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2806–2814. doi:10.1021/es015792r
- Zanardi-Lamardo, E., Clark, C.D., Zika, R.G., 2001. Frit inlet/frit outlet flow field-flow fractionation: methodology for colored dissolved organic material in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 443, 171–181.
- Zanardi-Lamardo, E., Moore, C.A., Zika, R.G., 2004. Seasonal variation in molecular mass and optical properties of chromophoric dissolved organic material in coastal waters of southwest Florida. *Mar. Chem.* 89, 37–54. doi:10.1016/j.marchem.2004.02.018
- Zhang, Y., Liu, M., Qin, B., Feng, S., 2009a. Photochemical degradation of chromophoric-dissolved organic matter exposed to simulated UV-B and natural solar radiation. *Hydrobiologia* 627, 159–168. doi:10.1007/s10750-009-9722-z
- Zhang, Y., van Dijk, M. a, Liu, M., Zhu, G., Qin, B., 2009b. The contribution of phytoplankton degradation to chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in eutrophic shallow lakes: field and experimental evidence. *Water Res.* 43, 4685–97. doi:10.1016/j.watres.2009.07.024
- Zhang, Y., Yin, Y., Feng, L., Zhu, G., Shi, Z., Liu, X., Zhang, Y., 2011. Characterizing chromophoric dissolved organic matter in Lake Tianmuhu and its catchment basin using excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. *Water Res.* 45, 5110–22. doi:10.1016/j.watres.2011.07.014
- Zhou, Q., Cabaniss, S.E., Maurice, P.A., 2000. Considerations in the use of high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances. *Water Res.* 34,

3505–3514. doi:10.1016/S0043-1354(00)00115-9

- Zhou, Z., Stolpe, B., Guo, L., Shiller, A.M., 2016. Colloidal size spectra, composition and estuarine mixing behavior of DOM in river and estuarine waters of the northern Gulf of Mexico. *Geochim. Cosmochim. Acta* 181, 1–17. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2016.02.032>
- Zimm, B.H., 1948a. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.* 16, 1093–1099.
- Zimm, B.H., 1948b. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering: preliminary results on polystyrene solutions. *J. Chem. Phys.* 16, 1099–1116.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38, 45–50. doi:10.1016/S0045-6535(98)00166-0



## Liste des productions scientifiques

### **Articles :**

Parot J., Parlanti E.

Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of low molecular weight dissolved organic matter

*En préparation pour soumission dans Journal of Chromatography A*

Parot J., Parlanti E.

Variations in dissolved organic matter molecular weight and optical properties along a microtidal estuary

*Soumis le 18/11/2016 dans Marine chemistry*

Parot J., Micheau C., Parlanti E.

Characterization of dissolved organic matter from river to ocean in the Seine estuary using molecular weight distribution and optical properties

*En préparation pour soumission dans Estuarine, Coastal and Shelf Science*

Parot J., Parlanti E., Guéguen C.

Examining molecular size of aquatic dissolved organic matter along a salinity gradient (Gironde estuary) using asymmetrical flow field-flow fractionation and EEM fluorescence

*En préparation pour soumission dans Environmental Science and Pollution Research*

Parot J., Parlanti E.

Seasonal dynamic of dissolved organic matter of the Seine estuary using multiple analytical and statistical approaches

*En préparation pour soumission dans Water Research*

Coelho C., Parot J., Gonsior M., Nikolantonaki M., Schmitt-Kopplin P., Parlanti E., Gougeon R. D.

Asymmetrical Flow Field Fractionation of white wine chromophoric colloidal matter

*Accepté dans Analytical and Bioanalytical Chemistry*

### **Communications orales:**

2014

Parot J., Susperregui N., Rouaud V., Dubois L., Anglade N., Parlanti E.

Tracing the "Liga" phenomenon in the Bay of Biscay through optical properties of the dissolved organic matter

*XIV International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay, 11-13 Juin 2014, Talence (France, Congrès international)*

2015

Parot J., Parlanti E., Guéguen C.

Examining molecular size and composition of aquatic dissolved organic matter using asymmetrical flow field-flow fractionation and orbitrap mass spectrometry

*ASLO 2015 (Association for the Sciences of Limnology & Oceanography), 22-27 Fevrier, Grenade (Espagne, Congrès international)*

Parot J., Parlanti E., Guéguen C.

Molecular characterization of dissolved organic matter in contrasted freshwater environments by

ultra-high resolution mass spectrometry and EEM fluorescence  
*European Geosciences Union 2015, 12-17 Avril, Vienne (Autriche, Congrès international)*

Parot J., Parlanti E., Guéguen C.

Evolution of molecular weight and type of dissolved organic matter in the Gironde estuary using asymmetrical field flow fractionation

*13th International Estuarine Biogeochemistry Symposium 2015, 7-10 Juin, Pessac (France, Congrès international)*

Parot J., Parlanti E., Guéguen C.

Retour d'expérience d'une mobilité internationale au Canada dans les recherches sur le développement de méthodes par fractionnement par couplage flux/force pour l'étude de la matière organique dissoute

*Assemblée générale LabEx COTE, 4 Décembre 2015 (Pessac)*

2016

Parlanti E., Nguyen P. T., Parot J., Guo Y., Cordier M.A.

Approche analytique pour l'étude des colloïdes environnementaux dans les milieux aquatiques naturels

*Journée Scientifique du Groupe Francophone de Fractionnement Flux-Force, Bordeaux, France, 28 Janvier 2016*

#### **Communications par affiche:**

2014

Parot J., Susperregui N., Rouaud V., Dubois L., Anglade N., and Parlanti E.

Application of EEM fluorescence spectroscopy in the understanding of the "LIGA" phenomenon in the Bay of Biscay (France)

*European Geosciences Union 2014, 27 Avril-2Mai, Vienne (Autriche, Congrès international)*

2016

Coelho C., Parot J., Parlanti E., Gonsior M., and Gougeon R.D.

Molecular and macromolecular signatures of white wine fluorophores supplied by fractionation tools

*European Geosciences Union 2016, 17-22 Avril, Vienne (Autriche, Congrès international)*





## Title

### **Methodological development of flow field-flow fractionation (AF4) and optical spectroscopy for the study of aquatic dissolved organic matter**

#### **Application to the Seine and Gironde estuaries.**

## Abstract

Dissolved organic matter (DOM) is a heterogeneous and complex mixture of molecules. It is involved in many physical, biological and chemical processes in aquatic ecosystems, especially in the major biogeochemical cycles or transport and bioavailability of contaminants.

Thus one of the current issues in many areas of research (chemistry, ecology, oceanography) is to better understand and characterize DOM in the environment. In this context, the aim of this work was the development of an analytical methodology for DOM analysis and separation, depending on its size, by asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). The development focused on the mobile phase, the cross-flow, the focus time and the use of organic macromolecules standards close to DOM, in order to calculate its molecular weight.

This optimized method, coupled with a UV/Vis detector, equipped with a 1kDa membrane, a 490µm spacer and a mobile phase of 5 mM phosphate buffer allowed us to study the MOD dynamics in estuarine environments.

The application of this method coupled to optical spectroscopy techniques (absorbance and fluorescence) permitted the study of MOD in the Seine and Gironde estuaries and to highlight the tidal and the seasonal effects on the size and type of DOM.

Furthermore, different statistical approaches have been developed to better understand the multiple variables (analytical or environmental), especially linear regression models or self-organizing maps (Kohonen).

**Keywords:** Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4); Dissolved organic matter (DOM); Analytical development; Statistical approaches; Self-Organizing Maps; Estuaries; Absorbance; Fluorescence



## Titre

### Développement méthodologique du fractionnement par couplage flux / force (AF4) et spectroscopie optique pour l'étude de la matière organique dissoute aquatique

#### Application aux estuaires de Seine et de Gironde

## Résumé

La matière organique dissoute (MOD) est constituée d'un mélange hétérogène et complexe de molécules. Elle intervient dans de nombreux processus physiques, biologiques et chimiques dans les milieux aquatiques, et notamment dans les grands cycles biogéochimiques ou le transport et la biodisponibilité des contaminants.

Ainsi un des enjeux actuels de nombreux domaines de recherche (chimie, écologie, océanographie) est de mieux comprendre et caractériser la MOD dans l'environnement. Dans ce contexte-là, l'objectif de ces travaux a été le développement d'une méthodologie analytique pour l'analyse et la séparation, en fonction de la taille, par fractionnement par couplage flux-force avec flux asymétrique (AF4) de la MOD. Le développement a principalement porté sur la phase mobile, le flux croisé, le temps de focus et l'utilisation d'étalons organiques proches de la MOD, permettant de calculer sa masse moléculaire moyenne.

Cette méthode optimisée, couplée à un détecteur UV/Vis, équipée d'une membrane de 1kDa, d'un espaceur de 490 $\mu$ m et d'une phase mobile de 5mM en tampon phosphate a permis l'étude de la dynamique de la MOD.

L'application de cette méthode couplée aux techniques de spectroscopie optique (absorbance et fluorescence) a permis l'étude de la MOD dans les estuaires de Seine et de Gironde mettant en avant les effets de la marée et des saisons sur la taille et le type de MOD.

De plus, différentes approches statistiques ont été développées afin de mieux appréhender les multiples variables (analytiques ou environnementales) et notamment les modèles de régression linéaire ou les cartes auto-organisatrices de Kohonen.

**Mots clés :** Fractionnement par couplage flux-force avec flux asymétrique (AF4); Matière organique dissoute (MOD); Développement analytique; Approches statistiques ; Carte auto-organisatrices de Kohonen ; Estuaires ; Absorbance ; Fluorescence